

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

M. Francisco Gomes VALLE MIRANDA,

Pharmacien

de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rio de Janeiro,

Ancien professeur de Sciences physiques et naturelles

au Lycée et à l'École Normale de Natal (Rio Grande do Norte, Brésil).

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU « PROTEUS VULGARIS »
HAUSER (RECHERCHES BIOCHIMIQUES COMPARÉES
SUR UNE RACE PATHOGÈNE ET UNE RACE SAPRO-
PHYTE).

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenu le 22 Novembre 1917, devant la Commission d'Examen.

MM. G. BERTRAND, *Président,*
MOLLIARD, } *Examinateurs.*
MICHEL, }

PARIS,

GAUTHIER-VILLARS ET C^{ie}, ÉDITEURS,

LIBRAIRES DU BUREAU DES LONGITUDES, DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE,
Quai des Grands-Augustins, 55.

1917

SÉRIE A, N° 100.

N° D'ORDRE :

81.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

M. Francisco Gomes VALLE MIRANDA,

Pharmacien

de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rio de Janeiro,
Ancien professeur de Sciences physiques et naturelles
au Lycée et à l'École Normale de Natal (Rio Grande do Norte, Brésil).

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU « PROTEUS VULGARIS »
HAUSER (RECHERCHES BIOCHIMIQUES COMPARÉES
SUR UNE RACE PATHOGÈNE ET UNE RACE SAPRO-
PHYTE).

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 27 Novembre 1917, devant la Commission d'Examen.

MM. G. BERTRAND, *Président,*
MOLLIARD, } *Examineurs.*
MICHEL, }

PARIS,

GAUTHIER-VILLARS ET C^{ie}, ÉDITEURS,

LIBRAIRES DU BUREAU DES LONGITUDES, DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE,
Quai des Grands-Augustins, 55.

1917



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS.

	MM.	
Doyen.....	P. APPELL, Professeur ..	Mécan. analytique et Mécan. céleste.
Professeur honoraire...	Ch. WOLF.	
	LIPPMANN.....	Physique.
	BOUTY.....	Physique.
	BOUSSINESQ.....	Physique mathématique et Calcul des probabilités.
	PICARD.....	Analyse supérieure et Algèbre sup.
	Y. DELAGE.....	Zoologie, Anatomie, Physiol. compar.
	Gaston BONNIER.....	Botanique.
	DASTRE.....	Physiologie.
	KÖNIGS.....	Mécanique phys. et expérimentale.
	VÉLAIN.....	Géographie physique.
	GOURSAT.....	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	HALLER.....	Chimie organique.
	JOANNIS.....	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET.....	Physique (Enseignement P. C. N.).
	WALLERANT.....	Minéralogie.
	ANDOYER.....	Astronomie.
	PAINLEVÉ.....	Mécanique rationnelle.
Professeurs.....	HAUG.....	Géologie.
	HOUSSAY.....	Zoologie.
	H. LE CHATELIER.....	Chimie.
	Gabriel BERTRAND.....	Chimie biologique.
	M ^{me} P. CURIE.....	Physique générale.
	CAULLERY.....	Zool. (Évolution des êtres organisés.).
	C. CHABRIÉ.....	Chimie appliquée.
	G. URBAIN.....	Chimie.
	Émile BOREL.....	Théorie des fonctions.
	MARCHIS.....	Aviation.
	Jean PERRIN.....	Chimie physique.
	G. PRUVOT.....	Zoologie, Anatomie, Physiol. comp.
	MATRUCHOT.....	Botanique.
	H. ABRAHAM.....	Physique.
	CARTAN.....	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	Cl. GUICHARD.....	Mathématiques générales.
	MOLLIARD.....	Physiologie végétale.
	N.....	Applicat. de l'Analyse à la Géométrie.
	N.....	Histologie.
	PUISEUX.....	Mécanique et Astronomie.
	LEDUC.....	Physique.
	MICHEL.....	Minéralogie.
	HEROUARD.....	Zoologie.
	Léon BERTRAND.....	Géologie.
Professeurs adjoints...	Rémy PERRIER.....	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
	COTTON.....	Physique.
	LESPIEAU.....	Chimie.
	GENTIL.....	Pétrographie.
	SAGNAC.....	Physique (Enseignement P. C. N.).
	PEREZ.....	Zoologie (Évolution des êtres organisés.).
Secrétaire.....	D. TOMBECK.	

A LA MÉMOIRE
DE
MES PARENTS.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A LA MÉMOIRE

DE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ÉLIE METCHNIKOFF,

MEMBRE DE L'INSTITUT, MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,
SOUS-DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR.

A

MONSIEUR LE DOCTEUR ÉMILE ROUX,

MEMBRE DE L'INSTITUT, MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR.

A

MONSIEUR LE PROFESSEUR GABRIEL BERTRAND,

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES ET A L'INSTITUT PASTEUR.

Homage respectueux et reconnaissant.

A

MONSIEUR LE DOCTEUR ALBERT BERTHELOT,

ASSISTANT A L'INSTITUT PASTEUR,
ANCIEN PRÉPARATEUR DE CHIMIE A L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE.

A MES MAITRES

DE

L'INSTITUT PASTEUR.

A MES MAITRES

DE LA

FACULTÉ DES SCIENCES.

En témoignage de ma profonde gratitude.

PREMIÈRE THÈSE.

CONTRIBUTION

A

L'ÉTUDE DU « *PROTEUS VULGARIS* »

HAUSER.

RECHERCHES BIOCHIMIQUES COMPARÉES

SUR

UNE RACE PATHOGÈNE ET UNE RACE SAPROPHYTE.

Introduction.

Sous le nom de *Proteus* on désigne en Bactériologie un genre de la famille des Bactériacées créé par Hauser (1) (1) en 1885. Ce genre est formé de trois espèces : *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* et *P. Zenkeri*, mais le nom *Proteus*, dans le langage courant, désigne particulièrement l'espèce *Proteus vulgaris*, de beaucoup la plus importante. Pour Macé et quelques autres bactériologistes les *Proteus* forment un groupe du genre *Bacillus* qui comprend non seulement les trois espèces indiquées ci-dessus, mais encore le *Bacillus Zopfii* qui a des relations étroites avec les espèces du genre *Proteus* de Hauser. Selon Lehmann et Neumann le genre *Proteus* de Hauser est à rapprocher du genre *Bacterium*.

Le *Proteus vulgaris* qui a été l'objet de mes recherches est nommé *Bacillus vulgaris* par Macé et *Bacterium vulgare* par Lehmann et Neumann et quelques autres auteurs ; je le désignerai toujours par le nom de *Proteus vulgaris* pour me conformer à

(1) Voir la Bibliographie, p. 89.

l'usage le plus général, et quand j'écrirai simplement *Proteus* c'est toujours cette espèce que je considérerai.

Voici d'ailleurs, d'après Lehmann et Neumann, la synonymie de ce microbe :

Proteus vulgaris Hauser; *Bacterium vulgare* Lehmann et Neumann; *Bacillus vulgaris* Macé, Migula; *Proteus Hauseri* de quelques auteurs; *Bacillus albus cadaveris* Strecker et Strassmann; *Urobacillus liquifaciens septicus* Krogius; *Bacterium fætidum ozæncæ* Hajek; *Bacillus Proteus vulgaris* Kruse. Nom vulgaire : *Proteus*.

Le nom de *Proteus* donné par Hauser à ce genre lui convient d'ailleurs particulièrement bien, car il donne l'idée du pléomorphisme qu'il présente en plusieurs circonstances.

Le *Proteus vulgaris* résiste non seulement à la congélation, mais il se reproduit encore à la température de la glacière; il tolère une assez grande alcalinité et une assez forte acidité, mais celle-ci lui est plus défavorable. Dans les laboratoires il se développe sur presque tous les milieux ordinaires, et aucun bacille asporogène n'est sans doute plus résistant à l'influence nuisible des agents naturels.

Le *Proteus vulgaris* est extrêmement répandu dans la nature et c'est avec raison que Meyerhof (2) l'a considéré comme un organisme presque ubiquitaire.

Comme l'a fait remarquer Hauser, le *Proteus* ne manque pour ainsi dire jamais dans les milieux ou sur les produits qui peuvent subir la putréfaction; les auteurs qui l'ont recherché systématiquement l'ont trouvé presque partout. Tils, Pfuhl, Mouginet, Pokrowski, Maggiora, Jäger, Zimmermann et Mez (3) l'ont isolé dans l'eau des tuyaux de conduite, des sources, des rivières et des canaux; Fülles, Grusdeff (4), dans le sol et la poussière; Welz (5) dans l'air et le brouillard; A. Sartory et Marc Langlais (6) dans l'air de Paris; Mouginet, Sanfelice, Tissier et Martelly (7) dans la viande en putréfaction; Schrank (8) dans les œufs pourris; Marpmann (9) dans l'encre, etc.

Récemment Ch. Cantù (10) a repris avec beaucoup de soin l'étude de la répartition du *Proteus* dans la nature et il a résumé dans le Tableau suivant les résultats de ses nombreuses expériences :

	Examens.	Recherches positives.	Pourcentage.
Air.....	100	0	0
Air du laboratoire.....	90	1	1,11
Poussières d'appartement...	70	0	0
Poussières de laboratoire,...	50	1	2
Eau potable.....	80	1	1,25
Glace alimentaire.....	90	0	0
Saucissons crus.....	30	10	33,3
Beurre.....	50	1	2
Fromages.....	20	3	15
Bananes.....	40	6	15
Melon.....	30	7	23,3
Raisin.....	104	0	0
Prunes.....	86	0	0
Poires.....	98	0	0
Cornichons.....	50	1	2
Céleris.....	40	7	17,5
Salades.....	20	4	20
Viandes pourries.....	22	22	100
Fumier.....	25	20	80
Mouches d'appartement.....	50	0	0
Mouches de fumier.....	50	6	12
Selles humaines normales...	50	15	30
Selles humaines diarrhéiques.	40	16	40
Bouche.....	40	5	12,5
Peau.....	30	2	6,6
Excréments de poule, alimen- tation normale.....	30	4	13,3
Excréments de poule, alimen- tation carnée.....	30	20	66,6
Sol de jardin.....	52	23	44,2

Le *Proteus* joue un rôle important dans la putréfaction des cadavres; celle-ci est même particulièrement accélérée lorsque le *Proteus* existait dans l'intestin avant la mort, car, à cause de son extrême mobilité, il envahit rapidement l'organisme tout entier. Cet envahissement se fait même parfois durant la période terminale de l'agonie.

Le *Proteus* est aussi un facteur important de la putréfaction des viandes de boucherie, qui sont infectées, soit par les microbes provenant du tube digestif des animaux abattus, soit par ceux du milieu extérieur. L'action du *Proteus* sur la viande de boucherie

est même particulièrement dangereuse pour l'homme, car elle détermine la formation de poisons capables de causer des accidents graves chez les personnes qui consommeraient des viandes ayant subi un commencement de putréfaction par ce microbe; parmi ces substances Tito Carbone a isolé notamment la gadinine, l'éthylènediamine, la choline et la triméthylamine.

Si le *Proteus* se trouve bien souvent sur les téguments, dans le tube digestif et les cavités naturelles de l'homme et des animaux, il n'y joue pas toujours le rôle d'un simple saprophyte et il se manifeste parfois comme un agent pathogène extrêmement actif.

Le *Proteus* est capable de causer à lui seul des otites, des mastoïdites, des méningites, des salpingites, des métrites, des abcès annexiels, des vaginites, de l'infection puerpérale, des abcès du foie, des septicémies, des néphrites, des panaris, des pleurésies, des phlegmons, des bronchites putrides, des angines, des ictères graves (maladie de Weil), des péritonites, des ostéomyélites, des rhinites ozéneuses. Il détermine parfois des phénomènes entériques particulièrement graves, notamment lorsqu'ils résultent de l'ingestion d'aliments profondément infectés; on a observé notamment des gastro-entérites à forme nettement hémorragique. M. Metchnikoff a rapporté deux cas de choléra nostras survenus à Conflans et à Paris qui avaient été pris pour des cas de choléra asiatique et qui étaient vraisemblablement dus au *Proteus*, car M. Salimbéni a constaté la présence de ce microbe, en très grande proportion, dans les matières diarrhéiques des sujets atteints. Dans les entérites chroniques de l'adulte à forme diarrhéique il paraît jouer un rôle important, mais où il semble surtout intervenir, c'est dans le choléra infantile. M. Metchnikoff l'a trouvé en effet dans les matières fécales de 204 nourrissons atteints de diarrhée estivale aiguë, sur 218 cas étudiés, soit dans 93,6 pour 100 des cas qu'il a examinés (11).

Voici d'ailleurs le Tableau des résultats obtenus par M. Metchnikoff au cours de ses recherches sur le choléra infantile :

En 1909, sur	36 cas.....	32 avec <i>Proteus</i>
En 1910, sur	34 cas.....	32 »
En 1911, sur	81 cas.....	78 »
En 1912, sur	47 cas.....	44 »
En 1913, sur	20 cas.....	18 »
	218 cas	204 avec <i>Proteus</i>

Certains autres auteurs ont aussi observé la constance du *Proteus* dans la flore intestinale des nourrissons atteints de gastro-entérite aiguë estivale et ont pressenti l'importance de son action pathogène dans ce cas particulier.

Enfin lorsqu'il n'intervient pas seul, le *Proteus* associé avec d'autres microbes imprime une gravité particulière aux affections déterminées par ceux-ci; c'est ainsi que l'on a observé des diphtéries, des dysenteries, des fièvres typhoïdes et des gangrènes pulmonaires dans lesquelles il a été possible de mettre en évidence son action nettement défavorable.

On voit donc l'importance extrême du *Proteus vulgaris* comme agent pathogène; cet importance se comprend d'ailleurs facilement d'un microbe qui est non seulement capable de donner naissance à des ptomaines, mais produit également des toxines actives exo et endocellulaires, et même parfois une hémolysine (12).

Il n'est donc pas étonnant que Foa et Bonome aient trouvé ce microbe dans un cas fatal de troubles intestinaux consécutifs à une parotidite et à une orchite; Lannelongue et Achard (13) deux fois dans les lésions de méningites putrides, associé au streptocoque, et deux fois dans des abcès mastoïdiens. D'autres auteurs les mentionnent comme l'agent de pleurésies putrides, gangrènes pulmonaires et bien d'autres maladies dans lesquelles il opère seul ou en collaboration avec d'autres microbes, notamment le streptocoque, le staphylocoque et le pneumocoque. Tout récemment, M. Weinberg (14), en étudiant la flore bactérienne des blessures de guerre, a constaté que le *Proteus* (parmi d'autres microbes, diplocoques, staphylocoques et streptocoques) avait un rôle favorisant à l'égard du *Bacillus perfringens*, agent principal du phlegmon gazeux et de la gangrène gazeuse. MM. A. Sartory, L. Spillmann et Ph. Lasseur (15) ont attribué un rôle analogue au *Proteus vulgaris* vis-à-vis du bacille d'Eberth dans la production de la fièvre typhoïde.

L'importance exceptionnelle de ce microbe justifie le très grand nombre de travaux dont il a été l'objet depuis sa découverte en 1885; les principaux d'entre eux sont indiqués dans la Bibliographie à la fin de cette étude.

Mais tous ces auteurs ont étudié soit sommairement un grand nombre de races, comme Ch. Cantù; soit examiné à fond deux

ou trois caractères biologiques ou biochimiques de quelques races comme Feltz, Nawiasky, Glaser et Hacla; soit approfondi l'étude d'ensemble de deux races comme Herter et Ten Broeck, mais aucun d'eux ne s'est attaché à la différenciation par une étude biochimique quantitative; de plus, ni les uns ni les autres n'ont essayé de préciser si les races de putréfaction et celles extraites des produits pathologiques étaient différentes. Il était intéressant notamment de savoir si les *Proteus* qui interviennent dans certaines gastro-entérites des nourrissons étaient identiques aux *Proteus* que l'on trouve dans la nature. Cela paraissait évident, ainsi que l'a fait remarquer M. Metchnikoff et ainsi qu'il résulte des recherches de Ch. Cantù et de celles de A. Berthelot, mais comme ces auteurs se sont livrés à l'étude, soit de quelques caractères morphologiques ou biochimiques, soit à des déterminations purement qualitatives, il était utile de comparer méthodiquement à tous les points de vue deux *Proteus* d'origine bien certaine et bien différente, afin d'établir s'ils n'appartenaient pas à deux races distinctes. A. Berthelot, dans sa Thèse, a d'ailleurs exposé dans les termes suivants l'intérêt que présenterait une telle étude :

« Les résultats que m'ont donnés mes essais avec le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose et la mannite sont assez constants, il me semble, pour aider à l'identification du *Proteus vulgaris*; d'autant mieux qu'ils confirment pour le glucose, le saccharose et le lactose les constatations des auteurs qui ont étudié quelques races avec des méthodes plus précises. Toutefois, ces résultats ayant été obtenus à l'aide d'un procédé purement qualitatif, je les considère simplement comme des renseignements utiles et je leur refuse toute valeur intrinsèque permettant de les utiliser à la distinction éventuelle de plusieurs races dans l'espèce créée par Hauser. A ce point de vue, seuls les dosages pourront fournir les données nécessaires (16). »

Ce sont précisément ces diverses considérations qui m'ont amené à entreprendre un ensemble de recherches dans le but d'établir, en précisant le mieux possible les caractères biologiques et biochimiques de deux *Proteus*, l'un isolé par M. Metchnikoff dans un cas mortel de gastro-entérite aiguë infantile, l'autre par moi dans de la viande en putréfaction, s'il serait possible de mettre en évidence des caractères différentiels suffisants pour

permettre de placer ces deux microbes dans deux races distinctes. Je ne me suis pas borné d'ailleurs à l'examen des caractères morphologiques et biologiques de mes deux *Proteus*, ainsi qu'à la détermination quantitative de leurs propriétés biochimiques, et j'ai recherché également si ces dernières variaient sensiblement sous l'influence de changements brusques de milieu.

Avant d'aborder l'exposé de mes expériences et des connaissances relatives à la variabilité biochimique des microbes, je tiens à rendre un hommage profondément reconnaissant à la mémoire de M. le Professeur Élie Metchnikoff; je n'oublierai jamais l'extrême bienveillance qu'il m'a témoignée en m'indiquant le sujet de ces recherches et en me permettant de travailler dans son service.

M. le Professeur Gabriel Bertrand a bien voulu m'autoriser à présenter ce Mémoire comme Thèse de doctorat à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris; avec une amabilité et une indulgence dont je garderai toujours le souvenir il m'a prodigué ses précieux conseils. Je suis heureux de lui exprimer ici ma sincère et respectueuse gratitude.

C'est également pour moi un agréable devoir que d'adresser mes plus vifs remerciements à mon ami le Dr Albert Berthelot qui m'a accueilli dans son laboratoire et n'a cessé de me guider dans mes études et mes recherches.

GÉNÉRALITÉS SUR LES VARIATIONS BIOCHIMIQUES DES MICROBES.

La variabilité des bactéries n'affecte pas seulement leur forme, mais aussi leurs propriétés physiologiques. De même que se modifient morphologiquement, sous l'action de certaines influences parfois minimes, les races d'une espèce microbienne, les propriétés biochimiques des générations successives d'une même bactérie sont susceptibles de changements souvent très importants. Le polymorphisme des bactéries, aujourd'hui admis sans conteste, a pour pendant un « polychimisme » dont l'étude est du plus haut intérêt non seulement pour la différenciation des espèces, mais aussi au point de vue de la biologie générale des bactéries et de leur rôle dans la nature.

La découverte de la variabilité biochimique des microbes a été faite par Pasteur (17) lui-même au cours de ses études sur la fermentation butyrique; il observa en effet que dans des conditions comparables le ferment butyrique produisait aux dépens du sucre et du lactate de calcium des proportions variables d'acide butyrique et d'alcool butylique. Pasteur ne poursuivit d'ailleurs pas l'étude de cette question, car il crut que ses cultures étaient impures et que les irrégularités d'action qu'il observait résultaient d'un mélange de deux ferments.

Plus tard, A. Fitz (18) trouva divers microbes présentant ce même caractère de variabilité, au double point de vue quantitatif et qualitatif, mais comme l'insuffisance de la technique ne donnait pas la certitude de la pureté des ferments étudiés, ses expériences sont sujettes à discussion. Seules, les recherches effectuées depuis que nous possédons le moyen d'obtenir des cultures pures peuvent être prises en considération quand on veut démontrer que les propriétés physiologiques des espèces microbiennes sont aussi variables que leur forme.

Le premier exemple de variabilité fourni par un germe dérivé d'une seule cellule a été observé par Perdrix (19) en étudiant le Bacille amylozyme. Ce microbe, qui est un anaérobie et qui fait

fermenter les sucres et les matières amylacées, ne possède aucune action sur la cellulose et le lactate de calcium; aux dépens du sucre il donne de l'acide acétique, de l'acide butyrique, de l'acide carbonique et de l'hydrogène. Ces corps sont produits par lui en proportions très variables suivant la nature du milieu et l'âge des cultures ou plus exactement le nombre de générations qui s'y sont succédé.

Un autre exemple fort intéressant des variations biochimiques dans une même fermentation a été donné par le *Bacillus orthobutylicus*. Ce bacille anaérobie isolé et étudié par M. Grimbert (20) se différencie du *B. butyricus* de Pasteur et du *B. amylobacter* de Van Tieghem en ce qu'il ne détermine pas la fermentation du lactate de calcium et qu'il n'attaque pas la cellulose. Comme il fait fermenter le lactose et l'amidon il se distingue du Bacille butylique de Fitz; enfin, il est notablement différent du Bacille amylozyme de Perdrix puisqu'il donne de l'alcool butylique normal avec un grand nombre d'hydrates de carbone. M. Grimbert a constaté que les propriétés physiologiques des diverses générations du Bacille orthobutylique qui se produisent dans une même fermentation varient dans une large mesure sous l'influence de la durée de la fermentation, de la réaction du milieu, de l'accoutumance à tels ou tels aliments, etc. Aux dépens de la glycérine, de la mannite, du glucose, du saccharose, du maltose, du lactose, du galactose, de l'arabinose, de l'amidon, de la dextrine et de l'inuline il donne de l'acide carbonique, de l'hydrogène, de l'alcool butylique normal, un peu d'alcool isobutylique, de l'acide butyrique normal, de l'acide acétique et parfois un peu d'acide formique; à part ce dernier, ces produits sont constants, mais ils sont formés dans des proportions extrêmement variables suivant l'état physiologique des bacilles pris comme semence.

La levure même, si bien caractérisée par sa fonction de transformer le sucre en alcool et acide carbonique, n'échappe pas à cette variabilité ainsi que Pasteur l'a observé et que l'ont précisé Laurent (21), Mach et Portele, Thylman et Hilger (22), Rau (23), puis Effront (24) en établissant que les proportions de l'acide succinique et de la glycérine varient, entre elles et par rapport au sucre, sous des influences très diverses. Un exemple fort intéres-

sant au même point de vue a été également donné par quatre microbes étudiés par Péré (25) qui avaient pour caractère commun d'être des ferments lactiques, puisqu'ils produisaient tous en effet de l'acide lactique gauche lorsque l'azote leur était fourni exclusivement par les sels ammoniacaux, mais qui se séparaient en deux groupes formant respectivement les acides lactiques droit ou gauche dès que la peptone remplaçait comme source d'azote les sels ammoniacaux.

Quand on analyse l'ensemble des phénomènes qui se passent dans une fermentation, on s'explique fort bien la diversité apparente des propriétés biochimiques du ferment considéré. En effet, à mesure que la fermentation évolue, vieillit, si l'on y prélève de quoi ensemercer des récipients contenant le même milieu que la culture mère, ce n'est plus une semence absolument identique à la semence originelle qu'on y introduit, mais des germes provenant d'une série de générations qui se sont succédé dans un milieu dont la composition varie sans cesse et qui, par conséquent, ont subi l'influence des produits formés par les générations antérieures. La variation physiologique, biochimique, d'un ferment donné au cours d'une fermentation est simplement le résultat de la réaction sur le microbe des produits de la vie cellulaire telle que Duclaux l'a si bien définie dans ses leçons de Microbiologie (26).

Cependant, quand on fait des prises de semence successives dans une fermentation en cours et qu'on ensemece un milieu identique à celui qui a servi pour la fermentation mère, les générations de ferment qui s'y développent reprennent vite les caractères biochimiques moyens que le ferment accuse lorsqu'on le cultive dans le milieu considéré. Pour fixer dans une certaine mesure les propriétés biochimiques d'un ferment prélevé à un moment donné dans une fermentation, il faudrait le réensemencer un très grand nombre de fois dans un milieu de culture présentant la même composition que le liquide en fermentation lors de la prise de la semence; la *solidité* de cette fixation s'accroîtrait d'ailleurs à la faveur de l'accoutumance si l'on prenait soin, à chaque repiquage, de modifier la composition du milieu en augmentant progressivement la proportion de la ou des substances dont l'apparition dans la culture mère avait déterminé la variation biochimique du ferment. Encore faut-il remarquer que, faute de sélection, cette

acquisition, cette fixation d'un nouveau chimisme ne peut être que très lente quand les cultures sont réalisées en milieu liquide, car chaque prise de semence ne représente qu'une moyenne puisqu'elle renferme forcément des éléments jeunes possédant au maximum la propriété biochimique envisagée, mais aussi un mélange d'éléments appartenant aux générations précédentes.

Quoi qu'il en soit, les travaux qui viennent d'être énumérés ont établi d'une façon indiscutable que les propriétés biochimiques des microbes sont essentiellement variables et que cette variabilité se manifeste au cours même d'une fermentation donnée. Comme l'a si bien exposé Duclaux « une semence qu'on introduit dans un liquide fermentescible apporte des qualités héréditaires, dépendant du milieu dont elle provient, du temps qu'elle y a passé, du degré d'acclimatation qu'elle a subi. Dans un nouveau milieu, elle rencontre des conditions différentes de celles de son milieu d'origine, qui accentuent ou corrigent ses prédispositions héréditaires. Bien plus, elle modifie le milieu à mesure qu'elle y vit, de sorte que les cellules qui s'y forment, au bout de quelques heures ou de quelques jours, apportent elles-mêmes des habitudes et des prédispositions différentes de celles de leurs aînées, et pour tout dire en un mot, dès qu'il est démontré que le protoplasma d'une cellule n'a pas des propriétés immuables, nous sommes obligés, en raison de l'impressionnabilité que nous lui avons découverte, de le supposer en état de mutation continue ».

De ces notions il résulte qu'un microbe ne peut être caractérisé d'une façon absolue par ses seules propriétés fermentatives; il faut donc avoir sans cesse présent à l'esprit, non seulement le polymorphisme des bactéries, mais surtout leur polychimisme de manière à ne pas voir des espèces nouvelles dans de simples races ou variétés.

Les faits que nous a révélés l'étude des variations physiologiques ou biochimiques, de l'accoutumance, de l'adaptation et de la transmission héréditaire ont contribué et contribueront encore grandement aux progrès de la microbiologie, en imposant à tous ceux qui découvrent *ou croient découvrir* de nouveaux germes l'obligation d'examiner les caractères biochimiques avec plus de soin et à un point de vue plus général.

Au début de la microbiologie, alors qu'on ne savait pas encore séparer les germes à l'aide des milieux solides, les recherches sur

la variabilité des microbes ne pouvaient donner que des résultats très imprécis à cause de la coexistence, dans une même culture, d'éléments appartenant à diverses générations, mais du jour où l'isolement des colonies a été pratiqué couramment la sélection relative des germes a été possible à partir soit de très jeunes colonies, soit au contraire de très vieilles. Le nombre de faits remarquables qui ont été observés depuis cette époque est considérable, mais comme ils sont d'inégale importance, je ne retiendrai comme exemple que ceux dont l'intérêt se rattache uniquement à la variabilité des propriétés biochimiques (27).

Le pouvoir protéolytique des microbes est une des propriétés les plus sujettes à variation; Liborius (28) a observé qu'un grand nombre de bactéries perdent le pouvoir de liquéfier la gélatine lorsqu'on les contraint à végéter à l'abri de l'oxygène ou en présence de matières réductrices. Sanfelice (29), en cultivant pendant longtemps le Staphylocoque, le *Proteus*, le *B. subtilis*, la Bactéridie charbonneuse et le Vibron cholérique dans des conditions de plus en plus anaérobies, a obtenu des variétés qui même à l'air ne liquéfient plus la gélatine; Huppe et Wood (30) observèrent des faits analogues à l'aide de cultures en bouillon phéniqué.

Le pouvoir indologène est lui aussi très variable ainsi qu'on en trouvera plus loin la preuve pour le *Proteus*; il y a déjà longtemps d'ailleurs que Kruse (27), puis Peckham (31) ont observé des variations de cette propriété. Shiga aurait même obtenu une variété de bacille typhique produisant de l'indol en partant d'une très vieille culture de la race originelle.

L'ensemble des caractères biochimiques présente, suivant les espèces, une variabilité plus ou moins accusée; il existe peut-être des germes particulièrement remarquables à cet égard, mais jusqu'ici, en raison du peu d'intérêt pratique qu'auraient des recherches de ce genre sur des microbes dont le rôle dans la nature est de minime importance, les bactériologistes ont surtout étudié les microbes pathogènes et les principaux ferments.

Le *B. coli*, notamment, a été examiné par d'assez nombreux auteurs. Les uns ont observé que la culture de ce microbe, dans des milieux additionnés de phénol, détermine tantôt un accroissement, tantôt une diminution de son activité fermentative sur les hydrates de carbone.

Rodet et Rona (32), en se basant uniquement sur la variation

des caractères biochimiques, ont même affirmé avoir réalisé par des cultures en milieux appropriés la transformation du *B. coli* en bacille typhique; rien n'est venu du reste confirmer leur manière de voir et il n'y aurait pas à tenir compte de leurs recherches si elles n'étaient une nouvelle preuve de la variabilité de certaines races de colibacilles qui peuvent perdre la propriété de former de l'indol et de faire fermenter certains sucres.

Neisser et Massini (33), puis Burk (34) et Sauerbeck (35) ont observé et décrit des transformations brusques du *B. coli* relatives à son pouvoir d'attaquer le lactose. Par culture sur gélose d'Endo de la variété de *B. coli* qu'ils ont étudiée sous le nom de *B. coli mutabile*, il est possible de sélectionner des races qui n'attaquent pas le lactose.

Des variations analogues à celles du *B. coli* ont été obtenues avec des microbes du groupe *B. lactis aerogenes*; parfois même l'accroissement de l'action fermentative à l'égard des sucres a entraîné pour ces bactéries une forte atténuation de leur propriété si caractéristique de former du mucilage (Th. Gruber). Kruse puis Klotz ont constaté d'autre part que les passages par l'organisme animal donnaient des races qui faisaient fermenter les hydrates de carbone beaucoup moins activement.

Avec le bacille typhique, Kuwabara puis Müller obtinrent par des artifices de culture des variétés atypiques au point de vue de leur action sur les sucres; Twort (36) a réussi à fixer des races attaquant le lactose. Cet auteur, ainsi que Müller, ont observé des faits analogues avec les bacilles paratyphiques et les bacilles dysentériques.

Les microbes de ce dernier groupe ont fourni de très nombreux exemples de variations; depuis le début de la guerre l'étude des épidémies de dysenterie a montré l'extrême diversité des bacilles dysentériques et a fourni de nombreux exemples de variétés présentant avec les types bien connus (Shiga, Flexner, Hiss) des affinités biologiques évidentes, mais en différant nettement par l'action sur les sucres (37). Du reste, on avait déjà observé, en examinant les bacilles dysentériques isolés dans une même épidémie, voire chez un même individu, des transformations graduelles ou des mutations soudaines se traduisant par l'apparition de races capables d'attaquer des sucres que les variétés types ne font pas fermenter. L'existence de ces races aberrantes complique

d'autant plus l'étude des dysenteries bactériennes que les mutations de propriétés biochimiques s'accompagnent parfois de variations d'autres propriétés donnant naissance par conséquent à des types complètement nouveaux. Cette extrême variabilité n'est pas seulement l'apanage des bacilles dysentériques et on la retrouve aussi accusée chez les espèces appartenant aux groupes du *B. coli*, du *B. lactis aerogenes* et des bacilles paratyphiques. Elle ne surprend pas quand on songe à la diversité infinie des conditions dans lesquelles se trouvent les microbes qui peuplent le tube digestif.

Parmi les représentants de la flore intestinale pathologique, le vibron cholérique a été également l'objet de recherches sur la variation de ses caractères biochimiques. On a observé des races ne liquéfiant plus la gélatine ou ne produisant plus de présure; d'autre part Celli et Santori (38) puis Claussen (39) ont constaté que les cultures de certaines variétés de vibrons ne donnent pas la réaction indol-nitreuse, mais que la production simultanée d'indol et de nitrites peut être rétablie par de nombreux passages dans certains milieux.

Le bacille de la diphtérie a été lui aussi l'objet de recherches sur les variations de son action sur le glucose. Goodmann (40), par sélection de cultures en bouillon glucosé, est parvenu à obtenir deux races distinctes : l'une qui alcalinisait le milieu sucré, l'autre qui y produisait 5 pour 100 d'acide. Enfin, parmi les microbes pathogènes, on a constaté la variabilité biochimique évidente du Pneumocoque, du Streptocoque, du Méningocoque et du Bacille du charbon symptomatique.

Parmi les microbes saprophytes le ferment lactique, dont la fonction est si facile à étudier, est certainement celui dont on a le mieux examiné les transformations d'ordre biochimique.

Kayser (41) dès 1894 a montré que, par l'éducation dans des liquides de culture différents de leur milieu d'origine, on pouvait modifier l'activité biochimique des ferments lactiques, mais que les générations ainsi modifiées reprenaient leurs premières propriétés quand on les cultivait dans le milieu primitif.

Schierbeck (42) entre autres a réussi à obtenir et à fixer une race dont le pouvoir acidogène était très affaibli en cultivant le ferment lactique dans un milieu contenant du phénol. Tout récemment enfin M. Charles Richet a publié, sur les variations que

subit le ferment lactique sous l'influence des sels de thallium, une étude fort intéressante dont voici les principales conclusions :

Le ferment lactique normal s'accoutume facilement au nitrate de thallium et la race qui se développe sur du lait contenant $0^{\text{g}},12$ de sel toxique par litre est déjà très accoutumée. Progressivement on peut amener le ferment lactique à supporter $2^{\text{g}},20$ de nitrate de thallium par litre.

Lorsqu'on cultive le ferment lactique normal dans du lait contenant $0^{\text{g}},125$ de nitrate de thallium par litre la fermentation lactique diminue de moitié, tandis que la race accoutumée donne 112 d'acide alors qu'elle en produit 100 dans le lait sans thallium.

Quand le lait est additionné de $1^{\text{g}},50$ de nitrate de thallium par litre le ferment normal ne se développe pas tandis que le ferment habitué pousse assez bien ; peu à peu celui-ci s'accoutume davantage, à partir du neuvième jour de culture, et au douzième jour la fermentation lactique est plus intense que dans le lait normal.

L'accoutumance du ferment au thallium s'établit lentement et elle procède le plus souvent par mutations brusques, comme cela se passe pour les végétaux supérieurs. Ce qui est également très remarquable c'est que le ferment habitué au nitrate de thallium se développe de mieux en mieux en présence de ce poison en même temps qu'il pousse de moins en moins bien dans le lait normal. Dans une des expériences de M. Richet la race habituée au thallium n'a donné en moyenne, pendant les quatre premiers jours, que 330 d'acide dans le lait thallique (à $1,24$ pour 1000) et brusquement le cinquième jour la quantité d'acide est passée à 1000 alors que dans le même milieu la race non accoutumée donnait 100. Ce même ferment accoutumé qui, pendant les quatre premiers jours, donnait en lait normal 34 d'acide n'en a plus produit que 18 à partir du cinquième jour.

C'est donc entre le quatrième et le cinquième jour que brusquement la race déjà habituée a augmenté son accoutumance et déterminé l'apparition brusque dans une génération nouvelle d'un pouvoir ferment 3 ou 4 fois supérieur à celui des générations précédentes. De nombreuses expériences avec d'autres composés nocifs pour le ferment lactique ont montré à M. Richet que c'est seulement dans les milieux toxiques que l'on observe ces

mutations brusques avec très grand écart entre l'activité biochimique de la race originelle et celle de la race accoutumée. Tous ces faits sont extrêmement intéressants aussi bien au point de vue de la biologie générale qu'à celui de la biologie propre des bactéries, mais cette remarque même de M. Richet sur l'influence particulière des poisons sur l'apparition des mutations brusques montre la nécessité d'examiner aussi ce que deviennent les propriétés biochimiques des microbes quand on les cultive pendant longtemps dans des milieux plus favorables que les supports nutritifs usuels, soit au contraire dans des milieux possédant *in vitro* quelque une des propriétés défensives particulières aux humeurs de l'organisme animal (43).

Dans ce dernier ordre d'idées on peut signaler un travail récent de A. Berthelot (44) sur l'emploi de milieux de culture riches en trypsine et en érepsine actives et se prêtant cependant fort bien à la culture des microbes, car ils contiennent tous les termes de l'hydrolyse diastasique des protéiques de la viande, du pancréas et de la muqueuse intestinale. Avec ces milieux protéolytiques cet auteur a obtenu une variation du *Proteus vulgaris* consistant en une diminution considérable du pouvoir protéolytique et en une augmentation de la toxicité et de la virulence. Il semble que dans une certaine mesure la présence de diastases digestives influence le *Proteus* comme le feraient des passages par l'organisme animal ; mais, ainsi que le fait remarquer A. Berthelot, en raison de l'extrême variabilité de l'espèce qu'il a étudiée, il faut surtout voir dans les faits qu'il a observés l'intérêt que pourront présenter, pour l'étude des variations microbiennes, les milieux artificiels possédant cependant une des propriétés qu'utilise l'organisme animal dans sa lutte contre l'infection.

La question de la variabilité des microbes même au seul point de vue biochimique est d'ailleurs beaucoup plus complexe qu'elle ne le paraît à l'examen des faits que je viens de résumer. Pour chaque espèce en effet il faudrait déterminer si la transformation qui se produit, sous une influence donnée, n'affecte qu'une ou plusieurs actions biochimiques ; si cette transformation est une variation lente, facile à fixer et à renforcer, ou une mutation brusque ; si elle est stable ou instable, progressive ou régressive et enfin si elle n'est point le simple retour à un état ancien.

Le problème se complique encore bien davantage lorsqu'on n'examine plus la variation d'une espèce microbienne au seul point de vue de son chimisme, mais également à celui de sa morphologie, de sa toxicité et de sa virulence, car il faut alors se rendre compte si la variabilité affecte une seule propriété ou bien un ensemble de propriétés coordonnées fonctionnellement.

A ce propos il est bon de remarquer que ce sont les activités secondaires qui varient le plus facilement, celles dont l'existence n'est pas liée à la vie même de la cellule bactérienne, comme la production de pigment par exemple. Par contre les propriétés biochimiques fondamentales d'un microbe sont celles qui varient avec le plus de difficulté, au moins *qualitativement*, car les variations *quantitatives* d'une même action chimique comptent parmi les plus aisées à obtenir.

Ce qu'il importe surtout aux biochimistes ou aux bactériologistes de retenir, c'est la notion fondamentale de la variabilité des microbes, notion si bien définie par Duclaux (26) il y a plus de vingt ans et que, dans les conclusions de son étude de l'action des sels de thallium sur le ferment lactique, M. Ch. Richet vient encore de préciser ainsi en la complétant : « ...Le ferment lactique, comme probablement toute cellule vivante, est plastique, malléable, docile. On l'accoutume aux poisons, on change ses réactions et sa descendance modifiée devient différente de la race primitive. Mais cette modification paraît être brusque, rapide, succédant à de plus ou moins longues périodes d'uniformité, et cela confirme l'opinion des botanistes et des biologistes que les mutations héréditaires ne sont pas progressives, mais soudaines. La révolution ou, si l'on veut, l'évolution s'opère brutalement : *Natura facit saltus*. »

Nos connaissances actuelles sur la variabilité des microbes s'accordent pour rendre parfaitement plausibles tous les faits que je vais exposer plus loin à propos du *Proteus vulgaris*. Les variations que j'ai observées donnent une preuve nouvelle de l'identité probable des *Proteus* pathogènes et saprophytes, ainsi que de la facilité particulière avec laquelle cette espèce bactérienne modifie ses caractères biochimiques, mais dans cette variabilité même on trouve le sujet de réflexions inspirées des plus récents progrès de la microbiologie.

En effet, on sait maintenant que le procédé d'isolement des germes sur plaques de gélose ou de gélatine, ou en tubes profonds de gélose, ne donne pas infailliblement des colonies pures. L'emploi des milieux électifs solides augmente même les chances d'obtenir sur plaques des colonies de première génération mixtes et ces chances sont encore plus nombreuses quand la matière d'ensemencement renferme en abondance des germes d'une espèce se développant difficilement avec une petite quantité de germes d'une bactérie poussant bien sur le milieu d'isolement. Tous les bactériologistes consciencieux qui ont étudié longtemps des milieux aussi polymicrobiens que le contenu intestinal de l'homme et des animaux, le sol ou les matières en putréfaction, ont eu l'occasion d'être gênés par des faits de ce genre.

On a vu des cultures de diphtérie, provenant d'une colonie bien isolée sur sérum coagulé, se montrer contaminées de streptocoque ou de pneumocoque, et cela non immédiatement au deuxième ou troisième passage, mais beaucoup plus tardivement. Kruse ⁽¹⁾ pense avec raison que les prétendues transformations du *Bacillus* *faecalis alcaligenes* en Bacille typhique, décrites par divers auteurs, résultent simplement d'une erreur de ce genre et que l'avenir nous réservera sans doute bien des surprises analogues.

Il est parfaitement exact que le plus souvent, avec la majorité des bactéries et à l'aide des milieux courants, on obtient des colonies pures, surtout quand on prend la précaution de pratiquer des isolements successifs; mais lorsqu'on se trouve en présence d'un microbe dont la variabilité de toutes les propriétés est excessive, on peut se demander si elle ne résulte pas de la présence d'une seconde espèce accompagnant toujours la première, quelles que soient les précautions prises pour l'isolement, d'une sorte de parasite *au sens morphologique du mot* : virus filtrant, germe à la limite de la visibilité, voire même très petit microbe cilié entraîné par les nombreux cils d'une grande bactérie.

Pour me mettre à l'abri d'une telle cause d'erreur, j'ai pris toutes les précautions nécessaires et je n'ai commencé mes expériences qu'avec des cultures provenant de cinq isolements sur plaques de gélatine. Cette mesure de prudence m'avait été con-

(1) KRUSE, *loc. cit.*

seillée par M. A. Berthelot, qui avait également réisolé en série tous les échantillons de *Proteus* qu'il a étudiés et qui lui avaient cependant été donnés par d'éminents microbiologistes. C'est donc dans des conditions de sécurité aussi grandes que le permettent nos connaissances *actuelles* sur le *Proteus vulgaris* que j'ai entrepris les recherches exposées dans les Chapitres suivants ; bien des bactériologistes, très confiants dans leur habileté et dans la pureté des colonies microbiennes isolées par les méthodes usuelles, trouveront sans doute excessifs mes scrupules, mais ceux-ci ne surprendront certainement point les auteurs qui, depuis longtemps, étudient les espèces de la flore intestinale.

PREMIÈRE PARTIE.

ÉTUDE DES CARACTÈRES GÉNÉRAUX DE DEUX RACES DE « PROTEUS »

Avant d'aborder l'étude des propriétés biochimiques de mes deux races de *Proteus*, j'ai examiné comparativement ces deux microbes à l'aide des méthodes bactériologiques usuelles. Ce sont les résultats que cet examen m'a donnés que je vais exposer dans cette première Partie; ils me paraissent d'ailleurs présenter par eux-mêmes un certain intérêt, car j'ai tenu compte dans mes recherches des indications données récemment par Metchnikoff, Herter, Cantù et A. Berthelot. Grâce à celles-ci j'ai pu établir, pour mes deux *Proteus*, une description plus complète et plus précise à certains égards que ne le sont, pour la même espèce, celles de quelques ouvrages didactiques.

I. — ORIGINE ET MODE D'ISOLEMENT.

Un des *Proteus* que j'ai étudiés a été isolé en 1911, par M. Metchnikoff, dans les matières fécales d'un nourrisson atteint de gastro-entérite aiguë et ayant succombé en quelques jours à cette affection; je le décrirai dans ce travail sous le nom de *Proteus* M. Quant à l'autre, que je nommerai *Proteus* V, je l'ai isolé moi-même d'un fragment de viande de boucherie abandonné pendant quelques jours à la putréfaction, à la température ambiante.

Pour les deux microbes, le mode d'isolement a été le suivant : de la gélatine au bouillon peptoné a étéensemencée par piqûre avec les matières fécales ou la viande en putréfaction; au bout de 3 jours, le milieu ayant été partiellement liquéfié par le développement microbien, une trace de la culture a été déposée dans l'eau de condensation d'un tube de gélose inclinée, placé vertica-

lement. Au bout de 24 heures de séjour à 37°, au cours desquelles le développement microbien s'était effectué en « grim pant » le long de la couche de gélose, le milieu était complètement envahi par un enduit peu épais de microbes; une trace de culture a été alors prélevée à la partie supérieure du milieu, c'est-à-dire à l'endroit où se trouvaient les éléments les plus jeunes et les plus mobiles, et a servi à ensemen cer l'eau de condensation d'un nouveau tube de gélose inclinée maintenu vertical. Après 24 heures d'étuve un voile microbien ascendant ayant également envahi le milieu, une trace de cet enduit a été prélevée à la partie supérieure du tube et a été utilisée pour ensemen cer successivement, sans recharger le fil de platine, huit tubes de gélatine préalablement liquéfiée. Les quatre derniers de ces tubes, les moins chargés de microbes, ont été coulés, avec les précautions d'usage, dans quatre boîtes de Pétri stériles qui ont été placées, après solidification du milieu, dans l'étuve à 22°. Trois jours après, les colonies s'étant bien développées, la plus caractéristique de celles-ci a été choisie et une trace en a été prélevée, pour ensemen cer par piqûre un tube de gélatine. Avec la culture ainsi obtenue j'ai fait un nouvel isolement dans les mêmes conditions; j'ai répété trois fois encore la même opération et ce sont seulement les cultures du cinquième isolement qui ont servi de point de départ à mes expériences.

II. — CARACTÈRES MICROSCOPIQUES.

Forme et disposition des éléments. — Dans les préparations fixées par la chaleur et colorées par les couleurs d'aniline, les *Proteus* M et V se présentent sous l'aspect de bâtonnets à bouts arrondis, le plus souvent isolés, mais quelquefois placés bout à bout ou disposés parallèlement deux à deux. Toutefois le *Proteus* V est sensiblement plus fin, moins trapu que le *Proteus* M. Sur une même préparation on trouve des éléments de longueurs très variables.

Dimensions. — Les éléments de *Proteus* M présentent les dimensions suivantes : largeur 0^μ,5 à 0^μ,8; longueur 0^μ,8 à 4^μ. Les éléments de *Proteus* V ont comme largeur 0^μ,4 à 0^μ,5, leur longueur varie entre 0^μ,8 et 6^μ,4. Toutefois la majorité des éléments

de *Proteus* M mesurent environ 1^u,6 de longueur, tandis que pour le *Proteus* V la longueur est un peu supérieure à 2 μ .

Motilité. — Lorsqu'on examine à l'état frais les éléments microbiens provenant de cultures très jeunes sur gélose inclinée, de préparation récente, on constate qu'ils sont mobiles; mais tandis que le *Proteus* M n'accuse que des mouvements assez lents, au contraire le *Proteus* V parcourt avec une grande rapidité le champ du microscope. Sur des préparations traitées par la méthode de Van Ermengen on peut constater que le *Proteus* V et le *Proteus* M sont abondamment pourvus de cils sur toute la surface du corps microbien, cils qui sont cependant plus longs et plus fournis pour le *Proteus* V.

Action des colorants. — Le *Proteus* M et le *Proteus* V se colorent bien et uniformément par les couleurs d'aniline. Ils ne prennent jamais le Gram lorsqu'on les traite par le violet de gentiane aniliné, par la solution iodo-iodurée et qu'on les décolore par l'alcool-acétone de M. Nicolle. Ils ne présentent jamais le caractère d'acido-résistance.

III. — CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES.

Formes de résistance. — Quels que soient le milieu et l'âge des cultures, les *Proteus* M et V ne donnent jamais de spores; de même on ne trouve pas de formes d'involution dans les vieilles cultures de ces deux microbes.

Action de l'oxygène. — Les *Proteus* M et V sont nettement aérobies. Toutefois si l'on fait un vide relatif dans les tubes renfermant du bouillon qu'on vient d'ensemencer, on peut constater que le *Proteus* M se développe beaucoup mieux que le *Proteus* V dans des conditions semi-anaérobies.

Action de la chaleur. — Les plus riches cultures de *Proteus* M et V ont toujours été obtenues à 37°. Cependant, à cette température le *Proteus* M se développe nettement mieux que le *Proteus* V, tandis qu'à la température du laboratoire les cultures du *Proteus* V sont sensiblement plus riches que celles du *Proteus* M.

Un chauffage à 50° ne gêne en rien le *Proteus* M, mais diminue très nettement la vitalité du *Proteus* V. Les deux *Proteus* sont tués par un chauffage à 55° pendant 15 minutes.

IV. — CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES CULTURES.

Bouillon. — Le *Proteus* M et le *Proteus* V se développent également bien en bouillon Martin; au bout de 24 heures le milieu est complètement envahi par un trouble homogène.

Bouillon glucosé. — En bouillon Martin glucosé la culture des deux *Proteus* est aussi très abondante, mais le *Proteus* M se différencie par un dégagement gazeux manifeste.

Bouillon ascite. — En bouillon ascite le *Proteus* M donne au bout de 24 heures un léger trouble à la partie supérieure du tube, tandis que le *Proteus* V envahit complètement le milieu.

Bouillon sérum. — En bouillon sérum les deux *Proteus* donnent, au bout de 24 heures, un dépôt très abondant, mais tandis que pour le *Proteus* M le fond du tube est occupé par des bacilles agglomérés en une masse se dissociant difficilement, pour le *Proteus* V le dépôt est formé de flocons qu'une légère agitation dissocie facilement dans le liquide.

Lait tournesolé. — Dans les cultures sur lait tournesolé le *Proteus* M provoque, au bout de plusieurs jours, une coagulation incomplète du milieu à laquelle succède une redissolution partielle du coagulum. La protéolyse continue à s'accroître, mais au bout de 15 jours il reste encore une notable proportion de caséine. Avec le *Proteus* V il n'y a pas de coagulation apparente, mais l'aspect du milieu montre qu'il y a une digestion lente de la caséine.

Après quelques jours de culture la réaction du lait pour les deux *Proteus* est sensiblement neutre, mais tandis qu'au bout de 15 jours les tubes de *Proteus* M sont complètement décolorés, ceux de *Proteus* V sont entièrement bleus.

Gélatine. — Ensemencé par piqure dans des tubes de gélatine, le *Proteus* M ne liquéfie que très légèrement le milieu autour de

la piqûre, mais par contre beaucoup de colonies erratiques se développent dans l'épaisseur du milieu; au contraire le *Proteus V* provoque assez rapidement la liquéfaction du milieu autour de la piqûre et surtout à la surface.

Sur plaques de gélatine ni le *Proteus M* ni le *Proteus V* ne donnent de colonies mobiles; il est vrai que, lorsque j'ai fait mes essais, la gélatine avait été préparée très dure à cause de la température élevée du laboratoire. Au bout de 48 heures les deux microbes donnent de petites colonies rondes, presque transparentes, à bords légèrement radiés; les colonies du *Proteus V* sont plus petites que celles du *Proteus M*, mais par contre déterminent beaucoup plus vite la liquéfaction du milieu.

Gélose. — Dans les cultures sur gélose inclinée, aussi bien pour le *Proteus M* que pour le *Proteus V*, le milieu est complètement envahi au bout de 24 heures d'étuve à 37° par un enduit blanchâtre, translucide et d'apparence humide.

Gélose glucosée. — Sur gélose glucosée l'envahissement du milieu ne se fait pas aussi rapidement, et au bout de 24 heures il est possible d'observer des colonies arrondies, homogènes, transparentes, gris blanchâtre, très peu surélevées, mesurant en moyenne 2^{mm} de diamètre et à bords légèrement découpés; les colonies du *Proteus M* sont nettement plus surélevées que celles du *Proteus V*.

Gélose ascite. — Sur gélose ascite les *Proteus M* et *V*, ensemencés en strie, envahissent rapidement toute la surface du milieu en donnant une culture abondante d'un gris blanchâtre légèrement teinté de jaune.

Gélose au sang (gélose ordinaire à 3 pour 100 additionnée d'un cinquième de son volume de sang de lapin défibriné). — Ensemencée avec les *Proteus M* et *V* la gélose au sang prend rapidement à 37° une teinte brun chocolat sur laquelle se détache nettement la couleur gris sale légèrement teintée de vert de la culture microbienne très abondante.

Pomme de terre. — Sur pomme de terre ordinaire le *Proteus M* donne un enduit blanc jaunâtre déjà nettement apparent au bout

de 24 heures, tandis que le *Proteus V* ne donne, dans le même laps de temps, qu'une culture à peine apparente. Au bout de 15 jours la pomme de terre ensemencée avec le *Proteus M* présente une coloration café au lait foncé, tandis que la culture de *Proteus V* ne communique à son support qu'une teinte café au lait très clair.

Pomme de terre glycérinée. — Sur pomme de terre glycérinée, pour les deux *Proteus* la culture est plus grasse et plus abondante, mais la teinte de l'enduit du *Proteus M* est plus jaune que sur la pomme de terre ordinaire, tandis qu'au contraire la culture du *Proteus V* apparaît bien plus blanche. Au bout de 15 jours l'enduit du *Proteus M* et son support sont colorés en brun, tandis que dans les mêmes conditions l'ensemble de la culture de *V* est à peine coloré.

Bouillon de haricots. — En bouillon de haricots à 37°, le *Proteus M* donne en 24 heures un dépôt floconneux, alors que le *Proteus V* trouble simplement le milieu.

Urine. — Cultivé à 37° dans de l'urine humaine stérilisée par filtration sur bougie Chamberland, le *Proteus M* donne en 24 heures une culture abondante (trouble très accentué et dépôt floconneux), tandis que le *Proteus V* trouble simplement le milieu.

Eau peptonée. — Dans une solution aqueuse, à 2 pour 100 de peptone pancréatique de Defresne, le *Proteus M* détermine en 3 jours, à 37°, un trouble très abondant avec dépôt floconneux, tandis que le *Proteus V* trouble le milieu sans produire de dépôt.

Eau peptonée glucosée. — Les cultures vieilles de 10 jours en eau peptonée, glucosée à 10 pour 1000, sont nettement acides pour les deux *Proteus*, mais l'acidité des cultures de *Proteus M* correspond à 1^g, 127 d'acide sulfurique par litre, tandis que celle de *Proteus V* n'atteint que 0^g, 539.

Milieu de Gessard. — Dans le milieu de Gessard au succinate d'ammoniaque, le *Proteus M* détermine un trouble très intense, tandis que le développement du *Proteus V* est à peine sensible.

Milieu d'Uschinsky. — En liquide d'Uschinsky les deux

Proteus se différencie de la même manière que dans le milieu de Gessard.

V. — CARACTÈRES BIOCHIMIQUES.

Action sur les matières protéiques. — Ainsi que nous l'avons vu plus haut, les deux *Proteus* digèrent plus ou moins activement la gélatine et la caséine, mais l'un et l'autre se montrent sans action sur le blanc d'œuf coagulé; par contre, lorsqu'on les ensemence en strie à la surface du sérum coagulé, le *Proteus M* provoque en 24 heures la liquéfaction totale du milieu, tandis que le *Proteus V*, bien que se développant légèrement, ne manifeste aucune action protéolytique même après 15 jours.

Action sur diverses substances azotées définies. — Même ensemencés assez abondamment, les deux *Proteus M* et *V* ne peuvent subir des passages successifs sur les milieux d'isolement de A. Berthelot, à base de sels nutritifs et de très petites quantités de tyrosine, d'histidine, d'alanine, de tryptophane ou de glycocolle.

Avec des milieux analogues, mais dans lesquels l'azote est fourni par 2 pour 1000 d'urée, d'allantoïne, de caféine ou de créatine, le *Proteus M* se développe légèrement, tandis que le *Proteus V* ne cultive pas sensiblement.

Les *Proteus M* et *V* donnent des nitrites dans les milieux nitrates; tous les deux font apparaître une coloration jaune avec fluorescence verte dans l'eau peptonée additionnée de rouge neutre, toutefois le virage est plus rapide avec le *Proteus M* qu'avec le *Proteus V*.

Les cultures des deux microbes en solution de peptone pancréatique ⁽¹⁾ prennent toutes les deux une teinte rose quand on les additionne de nitrite de potassium et d'acide chlorhydrique, mais l'extrait éthéré des deux cultures ne donne la réaction de l'indol avec le diméthylaminobenzaldéhyde que pour le *Proteus V* ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Peptone pancréatique de viande de bœuf en paillettes marque Defresne.

⁽²⁾ Technique indiquée par A. Berthelot (*loc. cit.*).

En cultivant les deux microbes dans une solution contenant du tryptophane et l'ensemble des produits abiurétiques obtenus par l'hydrolyse acide de la caséine, les différences ci-dessus sont encore plus accentuées.

L'extraction successive de ces dernières cultures par l'éther, d'abord en milieu alcalin, puis en milieu acide, permet de constater que le *Proteus* M et le *Proteus* V produisent tous les deux de l'acide indol-3-acétique, mais que seul le *Proteus* V produit de l'indol dans les conditions ordinaires. Toutefois, *cultivé à 37° dans une solution ne contenant comme aliment organique que 1 pour 100 de tryptophane, le Proteus M y produit des traces d'indol, constatables seulement au bout de 4 jours.*

Aucun des deux *Proteus* ne donne de phénol ou de *p*-crésol même dans les très vieilles cultures en eau peptonée riche en tyrosine; par contre, dans les milieux peptonés ordinaires, ou même encore dans une solution aqueuse des produits d'hydrolyse acide des cheveux, les deux microbes donnent en abondance de l'hydrogène sulfuré.

Action sur les hydrates de carbone. — En 10 jours ⁽¹⁾ à 37°, le *Proteus* M et le *Proteus* V acidifient l'eau peptonée additionnée de glucose, de galactose, de saccharose, de xylose, de glucosamine, de glycérine ou d'esculine; dans les mêmes conditions et pour les deux microbes les cultures sont alcalines pour le lactose, la glycérine, la dulcité, l'érythrite, la dextrine, l'amidon, l'inuline, le glycogène, l'arabinose, le mannose, le raffinose, le rhamnose, la sorbite, l'inosite, la salicine, l'amygdaline, l'arbutine et le méthylglucoside β .

Toujours dans les mêmes conditions, le *Proteus* M et le *Proteus* V se distinguent par les caractères suivants :

1° Le *Proteus* M acidifie le milieu au lévulose dont la réaction devient alcaline avec le *Proteus* V.

2° Le *Proteus* V acidifie les milieux au maltose, ou au méthyl-

(1) Ainsi que l'a montré A. Berthelot, il est indispensable, dans l'étude qualitative de l'action du *Proteus* sur les sucres, de ne tenir compte que des résultats obtenus après 10 jours à 37°; en effet, lorsqu'on examine plus vite les cultures, la production d'ammoniaque masque souvent la formation d'acide.

glucoside α , dont la réaction finale est alcaline avec le *Proteus* M.

VI. — POUVOIR PATHOGÈNE.

CULTURES TOTALES (cultures en bouillon Martin âgées de 48 heures) :

Souris (poids moyen, 20^g) :

Injection sous-cutanée. — Ni le *Proteus* M ni le *Proteus* V ne tuent la souris à la dose de 1^{cm³} en injection sous-cutanée.

Injection intra-péritonéale. — Un demi-centimètre cube de culture injecté dans le péritoine des souris de 12^g à 15^g les tue en 18 heures pour le *Proteus* V et en plus de 24 heures avec le *Proteus* M.

Cobaye (poids moyen, 500^g à 600^g) :

Injection sous-cutanée. — L'injection de 2^{cm³} de culture de *Proteus* M dans le tissu cellulaire sous-cutané du cobaye provoque l'apparition de lésions qui, au bout de 8 jours, se manifestent sous la forme d'une eschare brunâtre, sèche, de la grandeur d'une pièce de 2^{fr} (diamètre : 27^{mm}) et prête à se détacher. Dans les mêmes conditions le *Proteus* V a déterminé un petit abcès, à peine fluctuant, de la grosseur d'une amande.

Injection intra-péritonéale. — Les injections intra-péritonéales de 2^{cm³} de culture de *Proteus* M déterminent la mort du cobaye en 18 heures, tandis que cet animal ne succombe qu'au bout de 5 jours avec le *Proteus* V.

Lapin (poids, environ 2000^g) :

Injection sous-cutanée. — Injecté à la dose de 5^{cm³} sous la peau du lapin, le *Proteus* M détermine en 8 jours la formation d'un abcès sous-cutané large de 1^{cm},5 et long de 4^{cm}, tandis que le *Proteus* V provoque la formation d'un abcès à peine gros comme une amande.

Injection intra-veineuse. — Les lapins succombent en 24 heures à une injection intra-veineuse de 2^{cm³} de culture de *Proteus* M ou V; toutefois la mort survient plus lentement avec le *Proteus* V,

Injection intra-péritonéale. — Au contraire, à la suite des injections intra-péritonéales de 5^{cm³} les animaux succombent plus vite, dans un temps d'ailleurs très variable, avec le *Proteus V* qu'avec le *Proteus M*.

TOXINE (culture en bouillon Martin âgée de 10 jours, filtrée sur bougie Chamberland) :

Cobayes d'environ 500^g; en injection péritonéale, il faut atteindre 12^{cm³} pour provoquer la mort en 48 heures avec le *Proteus M*; à la même dose le filtrat de *Proteus V* ne se montre pas toxique.

CORPS MICROBIENS VIVANTS (culture de 24 heures, tubes de gélose de 22^{cm} de long et 22^{mm} de diamètre, diluée dans 20^{cm³} d'eau physiologique) :

Lapins d'environ 1750^g; 2^{cm³} de *Proteus V* en injection intra-péritonéale provoquent la mort en 24 heures, tandis que le délai est de 48 heures pour le *Proteus M*.

VII. — RÉACTIONS D'IMMUNITÉ.

Agglutination. — Le sérum des animaux préparés avec le *Proteus M* agglutine jusqu'au $\frac{1}{1000}$ le *Proteus M* et le *Proteus V*. Le sérum des animaux injectés avec le *Proteus V* agglutine également jusqu'au $\frac{1}{1000}$ les deux microbes.

DEUXIÈME PARTIE.

ÉTUDE BIOCHIMIQUE COMPARÉE DE DEUX RACES DE « PROTEUS ».

Dans cette deuxième Partie, je vais exposer les recherches que j'ai faites pour essayer de préciser, à l'aide de méthodes quantitatives, les propriétés biochimiques respectives de mes deux races de *Proteus*.

Je me suis limité à un petit nombre de substances, parce qu'il m'a paru inutile d'examiner l'action de mes microbes sur celles qui ne sont point communément employées par les bactériologistes; le but de mon travail n'était pas seulement, en effet, de faire une distinction entre deux *Proteus* d'origines différentes, mais aussi de voir dans quelle mesure coïncident les données fournies par les procédés qualitatifs usités dans les laboratoires médicaux et celles qui résultent de dosages directs effectués avec une technique aussi rigoureuse que peut le permettre la constitution si complexe des cultures microbiennes (¹).

I. — ACTION SUR LES HYDRATES DE CARBONE.

Pour étudier l'action des deux *Proteus* sur les hydrates de carbone, j'ai employé comme milieu de l'eau peptonée à laquelle

(¹) Depuis que j'ai terminé mes expériences, M^{lle} A. Horowitz a publié une intéressante étude sur de nombreux échantillons de *Proteus vulgaris* isolés à Petrograd au cours d'une épidémie de gastro-entérite aiguë (*Annales de l'Institut Pasteur*, 7 juillet 1916). Elle a étudié leur action sur les sucres et leur pouvoir indologène; mais, comme elle ne donne aucun détail sur les conditions dans lesquelles ont été effectuées ses recherches, il m'est impossible de comparer les résultats que j'ai obtenus avec les siens. Ses constatations doivent résulter de l'emploi des méthodes imprécises qu'emploient la plupart des bactériologistes quand ils étudient les propriétés biochimiques des microbes, car elles ne diffèrent pas de celles qui ont été publiées antérieurement au travail de Herter et Ten Brœck.

j'ajoutais une quantité variable d'un aliment hydrocarboné et un excès de carbonate de calcium. Pour la préparation de cette eau peptonée je n'ai pas pris n'importe quelle peptone, et c'est intentionnellement que j'ai fixé mon choix sur la peptone pancréatique de viande de Defresne. Trop souvent, les bactériologistes oublient que les peptones commerciales sont des produits de constitution variable, dans la composition desquelles entrent des composés de nature très diverse suivant le mode de préparation et la substance protéique utilisée. Certaines peptones ne renferment que des albumoses, d'autres une petite quantité de peptones vraies avec beaucoup d'albumoses, d'autres enfin sont constituées à la fois par des acides aminés libres, des polypeptides et des peptones vraies ; il n'est donc pas indifférent d'employer telle ou telle marque et l'on ne doit fixer son choix qu'après avoir précisé l'origine et la nature des peptones dont on dispose. Pour l'étude des propriétés saccharolytiques d'un microbe comme le *Proteus*, ce choix présente même une importance particulière ; en effet, le *Proteus* est capable à la fois d'attaquer les substances albuminoïdes et certains hydrates de carbone ; mais ce qui l'emporte chez lui, c'est le pouvoir destructif des protéiques. Non seulement il peut produire à leurs dépens des amino-acides, mais même désaminer ces derniers ; quand on met donc à sa disposition à la fois un hydrate de carbone et un dérivé peu dégradé de l'albumine, une grande partie de son énergie est employée à la digestion du protéique, tandis que, si on lui fournit avec l'aliment hydrocarboné le résultat d'une hydrolyse déjà très avancée d'albumine, il n'aura plus à dépenser autant d'activité pour simplifier l'aliment azoté et une plus grande énergie sera appliquée à l'attaque de l'hydrate de carbone.

Pour le but que je me proposais, j'ai donc été amené à rechercher parmi les peptones commerciales celles qui étaient les plus dégradées ; j'ai donné la préférence à la peptone Defresne parce que j'ai pu m'assurer qu'elle était préparée en soumettant simplement la viande de boucherie à la digestion pancréatique, et que j'ai vérifié, par le brome et la tyrosinase, qu'elle renfermait bien du tryptophane et de la tyrosine libres. J'aurais pu, il est vrai, utiliser un produit de digestion infiniment plus avancée, tel que ces préparations commerciales obtenues en soumettant de la viande à l'action de la trypsine et de l'érepsine pendant un temps très long, préparations que certains chimistes allemands ont proposées pour

l'alimentation par voie rectale des malades et des nourrissons débiles; mais je m'en suis abstenu pour deux raisons : d'abord parce que je tenais à ne pas trop m'éloigner des conditions dans lesquelles se sont placés les auteurs qui ont déjà étudié les propriétés saccharolytiques des *Proteus*, et ensuite parce que ces produits éreptiques sont trop souvent souillés de substances qui résultent non plus de l'action des diastases digestives, mais bien de celle des microbes sur les acides aminés (43), substances que je ne voulais pas introduire dans mes milieux, qu'elles auraient peut-être pu rendre moins propres au développement du *Proteus*.

Pour préparer l'eau peptonée dont je me suis servi dans les expériences qui vont suivre, je dissolvais 2 pour 100 de peptone dans de l'eau distillée et je portais cette solution à l'ébullition pendant 5 minutes en présence d'une petite quantité de carbonate de calcium précipité, bien exempt de carbonate de sodium. Je filtrais le liquide bouillant et, à l'aide d'une solution de soude au $\frac{1}{10}$, j'achevais de le neutraliser exactement au tournesol.

GLUCOSE.

Je me suis servi de glucose purifié par trois cristallisations successives dans l'alcool méthylique. En opérant à l'aide d'une fiole jaugée, j'ai dissous 9^g,8 du sucre dans de l'eau peptonée et amené la solution au volume de 350^{cm}³; ce milieu titrait donc approximativement 2,8 pour 100 de glucose.

J'ai préparé alors six fioles coniques d'Erlenmeyer en verre de Bohême, de 125^{cm}³, dans chacune desquelles j'ai placé environ 1^g,20 de carbonate de calcium pur précipité léger (1) bien tamisé. Après avoir filtré sur papier le milieu sucré, je l'ai réparti dans les six fioles en introduisant dans chacune d'elles 50^{cm}³ de solution mesurés *très exactement*, à l'aide d'une pipette à deux traits; j'ai alors bouché les fioles avec du coton cardé et, après les avoir recouvertes d'un capuchon épais de papier à filtrer, ficelé sur leur col, je les ai stérilisées à 115° pendant 30 minutes. Chacune d'elles

(1) Au sujet des caractères physiques que doivent présenter les carbonates de calcium destinés à la saturation de petites doses d'acides faibles, voir le récent travail de A. Berthelot dans le *Bulletin général de Thérapeutique*, avril 1917, page 454.

contenait donc exactement la même quantité de glucose, quantité voisine de 1^g,40.

Je les ai ensuite abandonnées 24 heures à l'étuve à 37° afin de m'assurer de la stérilité du milieu, puis je les ai étiquetées ainsi :

- 1^o Deux fioles : Glucose-Témoin;
- 2^o Deux fioles : Glucose-*Proteus* V;
- 3^o Deux fioles : Glucose-*Proteus* M.

J'ai alors laissé telles quelles les deux fioles témoins et j'aiensemencé les quatre autres avec le *Proteus* correspondant aux indications de l'étiquette, puis après avoir remis les capuchons, j'ai placé les six fioles côte à côte à l'étuve à 37°.

Le lendemain le milieu était très louche dans les fioles ensemencées et parfaitement clair dans les autres; avec beaucoup de précautions je les ai agitées deux fois circulairement, toutes les six et chaque jour; pendant 9 jours j'ai répété cette agitation. Le dixième jour, après avoir vérifié une dernière fois la parfaite limpidité du milieu témoin, je les ai retirées de l'étuve; j'ai séparé une fiole de chaque sorte pour les conserver à la glacière en cas d'accident, et j'ai conservé les autres pour y doser le glucose.

Pour doser ce sucre je me suis servi du procédé volumétrique de G. Bertrand (46).

J'ai donc préparé tout d'abord les quatre solutions suivantes :

A. — *Liqueur cuivrique.*

Sulfate de cuivre pur.....	40 ^g
Eau distillée, q. s. p.....	1 ^l

B. — *Liqueur sodique.*

Sel de Seignette.....	200 ^g
Soude caustique en plaques (1).....	150 ^g
Eau distillée, q. s. p.....	1 ^l

C. — *Liqueur ferrique.*

Sulfate ferrique.....	50 ^g
Acide sulfurique.....	200 ^g
Eau distillée, q. s. p.....	1 ^l

(1) On peut remplacer la soude en plaques par 375^{cm}³ de lessive de soude à 36° B.

D. — *Liqueur permanganique.*

Permanganate de potassium.....	5 ^g
Eau distillée, q. s. p.....	1 ^l

J'ai additionné la liqueur ferrique de quelques gouttes de la liqueur de permanganate, jusqu'à ce qu'une goutte ait donné une très légère teinte rose à peine perceptible, mais permanente.

J'ai alors titré très soigneusement la liqueur permanganique à l'aide d'une solution préparée avec de l'oxalate d'ammonium très pur et possédant seulement son eau de cristallisation; dans la suite j'ai vérifié de temps en temps son titre.

J'ai procédé alors de la façon suivante au dosage du glucose contenu dans la fiole de milieu témoin et dans chacune des deux autres : je filtrais sur un petit filtre à plis en papier le liquide à examiner et, avec de l'eau distillée chaude, je lavais avec soin la fiole, le filtre et le carbonate de calcium afin de bien rassembler tout le sucre dans le filtrat. Après refroidissement de celui-ci je le déféquais par le procédé de Patein (47) en l'additionnant d'un excès de liqueur de nitrate mercurique (1) et en ajoutant alors goutte à goutte une solution de soude jusqu'à réaction neutre au tournesol. Je filtrais en épuisant soigneusement le précipité avec de l'eau distillée chaude et j'introduisais dans le filtrat de 8^g à 10^g de poudre de zinc. J'agitais souvent le mélange pendant 3 heures et au bout de ce temps je m'assurais de l'absence complète du mercure en mettant une goutte du liquide sur une lame de cuivre récemment polie et exempte de toute trace de corps gras, et en constatant que celle-ci n'était pas tachée de gris; je filtrais toujours avec beaucoup de soins pour ne pas perdre de sucre, et j'épuisais le dépôt avec de l'eau distillée chaude. J'additionnais la liqueur filtrée de lessive de soude jusqu'à neutralisation au tournesol et je filtrais une dernière fois pour séparer l'hydrate d'oxyde de zinc en observant toutes les précautions nécessaires pour ne rien perdre du glucose. Je recueillais la liqueur provenant du témoin dans un ballon jaugé de 500^{cm}³, et je complétais avec de l'eau distillée jus-

(1) Pour la formule de cette liqueur, voir G. DENIGÈS, *Chimie analytique*, 1913, p. 1179, ou DORVAULT, *L'officine*, 1910, p. 86, ou encore Albert MOREL, *Précis de technique chimique à l'usage des laboratoires médicaux*, 1909, p. 334.

qu'au trait de jauge, puis j'agitais pour obtenir une solution bien homogène.

Quant aux liqueurs des cultures, je les recevais dans des fioles non jaugées, car je devais les concentrer sous pression réduite.

Les trois liqueurs étaient ainsi complètement débarrassées de toutes les substances qui s'opposaient au dosage du glucose par le procédé de G. Bertrand. J'ai alors prélevé de la liqueur correspondant à la fiole témoin 20^{cm^3} que j'ai versés dans une fiole d'Erlenmeyer de 150^{cm^3} , en y ajoutant successivement 20^{cm^3} de la liqueur cuivrique A et 20^{cm^3} de la liqueur sodique B. J'ai chauffé alors la fiole jusqu'à ébullition du contenu, ébullition que j'ai maintenue exactement 3 minutes à partir du dégagement des premières bulles, mais en évitant qu'elle soit trop vive pour ne pas concentrer exagérément le liquide.

J'ai alors retiré la fiole du feu et j'ai laissé quelques instants se déposer l'oxydure de cuivre, puis j'ai passé le liquide sur un filtre d'amiante ⁽¹⁾. La bonne confection de celui-ci ayant une grande importance, je reproduis ici textuellement les indications données par G. Bertrand ⁽²⁾.

« Pour la filtration, on se sert d'un tube à amiante genre Soxhlet, monté à l'aide d'un bouchon de caoutchouc sur une fiole conique, pas trop épaisse, de 150^{cm^3} de capacité. On fait le vide dans la fiole par l'intermédiaire d'une tubulure latérale. Le tube à amiante a $1/4^{\text{m}}$ de longueur totale. La partie supérieure, de 6^{cm} de longueur et de 17^{mm} environ de diamètre, est cylindrique. Ce tube est assez fortement étranglé pour retenir l'amiante et se prolonge au-dessous de l'étranglement par une partie tirée en cône, qui rentre dans le bouchon de caoutchouc. On obtient un bon filtre en opérant comme il suit : on choisit de l'amiante en grosses fibres un peu dures et l'on en fait une pelote sphérique, du diamètre du tube, que l'on pousse jusqu'à l'étranglement, en la pressant un peu. Au-dessus, on place une petite couche d'amiante beaucoup plus fine, obtenue en broyant de l'amiante ordinaire, à fibres douces,

(¹) Bien entendu, dans tous mes dosages de sucres, je n'ai effectué la filtration qu'après avoir constaté, par la coloration, que la liqueur, après ébullition, renfermait encore un large excès de cuivre.

(²) *Loc. cit.*

avec de l'eau; on décante les parties les plus fines qu'on met à part; on jette la bouillie restante sur le tampon et l'on essore.

» Enfin, on termine la préparation du filtre en y faisant passer les portions les plus fines de l'amiante qu'on a séparées par broyage et décantation. La dernière couche ainsi obtenue, celle qui agit vraiment comme filtre, doit avoir au moins 2^{mm} à 3^{mm} d'épaisseur; les deux premières lui servent simplement de support; elles ont ensemble à peu près 1^{cm}. On doit veiller à ce que chaque couche ait une épaisseur régulière et une surface horizontale. Quand on a un peu d'habitude, il suffit de quelques instants pour préparer un très bon filtre d'amiante pouvant servir à un très grand nombre de dosages (quelquefois plusieurs centaines). »

En filtrant et en lavant j'ai eu soin d'opérer de manière à laisser presque tout l'oxyde cuivreux dans la fiole et à ne presque pas en avoir sur le filtre. Après avoir vidé les eaux de lavage du récipient de l'appareil de filtration et l'avoir bien rincé à l'eau distillée j'ai mis 6^{cm³} de la liqueur ferrique C sur l'oxydule de cuivre; j'ai alors lavé la fiole, où j'avais dissous l'oxyde cuivreux, à plusieurs reprises avec quelques centimètres cubes de la liqueur ferrique jusqu'à en avoir employé 20^{cm³} en tout, en versant toujours ces liquides de lavage sur le filtre et en m'aidant pour cela d'une petite baguette en verre. Enfin j'ai lavé la fiole et l'entonnoir deux fois avec 10^{cm³} d'eau distillée à la fois en repassant de la même manière ces liquides sur le tube à amiante.

De cette façon tout l'oxydule se trouvait rassemblé en solution à l'état de sulfate de cuivre, dans la fiole épaisse à filtration, le sulfate ferrique étant passé à l'état de sulfate ferreux pour une quantité correspondant à celle de l'oxyde cuivreux.

J'ai alors déterminé la quantité de sulfate ferreux formée par un titrage au permanganate (liqueur D) et, à l'aide des Tableaux de G. Bertrand, j'ai calculé la teneur en glucose du milieu témoin.

Des essais préliminaires m'ayant montré que la proportion de glucose restant dans les cultures était très faible, j'ai été forcé de concentrer les liqueurs déféquées. J'ai même été obligé d'opérer cette concentration dans le vase où je devais effectuer la réduction de la liqueur cuivrique; dans ce but j'ai taré une fiole d'Erlenmeyer de 150^{cm³} en verre d'Iéna, choisi aussi épais que possible; j'y ai versé une partie de la liqueur à concentrer, et je l'ai placé

sur les rondelles d'un bain-marie bouillant après l'avoir relié à une trompe à eau, par l'intermédiaire d'un réfrigérant et d'une fiole épaisse tubulée. J'ai alors fait le vide que j'ai maintenu seulement à 350^{mm} de mercure à cause du peu de résistance du vase d'évaporation et, par des additions successives de liqueur sucrée et finalement d'un peu d'eau de lavage, j'ai concentré dans ma fiole conique tarée les quelques centigrammes de glucose que j'avais à doser pour chacune de mes liqueurs.

Connaissant le poids de mes deux fioles il m'a été facile d'amener la solution sucrée au volume de 20^{cm³} et de déterminer la quantité de sucre exactement dans les mêmes conditions que pour le témoin.

Voici les résultats que j'ai obtenus :

Glucose dans 50^{cm³} de milieu.

Milieu témoin.....	g 1,374
Culture de <i>Proteus</i> V.....	0,019
Culture de <i>Proteus</i> M.....	0,015

La quantité de sucre introduite dans chaque fiole de culture étant la même que pour le témoin, il s'ensuit que le *Proteus* V a consommé 98,6 pour 100 du glucose et le *Proteus* M 98,9, c'est-à-dire pratiquement la même chose. Les deux microbes possèdent donc à l'égard du glucose une action quantitativement identique.

LÉVULOSE.

J'ai opéré sur le lévulose préparé avec de l'inuline et purifié par trois cristallisations dans l'alcool absolu. Comme on sait que le pouvoir rotatoire de cette substance est modifié par le chauffage et que je tenais à éviter toute altération quelle qu'en soit la nature, j'ai stérilisé par filtration, sur bougie de porcelaine Chamberland, mon milieu sucré. Celui-ci a été préparé dans les mêmes conditions que pour le glucose, si ce n'est que, prévoyant une baisse de concentration à la suite de la filtration, j'ai élevé à 3,5 pour 100 la teneur en sucre.

A cause des pertes inhérentes à la stérilisation à froid j'ai préparé 400^{cm³} d'eau peptonée lévulosée, que j'ai filtrée sur bougie à l'aide

de l'appareil de Martin à ballon de répartition. J'ai transvasé aseptiquement le liquide stérile dans une fiole à fond plat stérilisée à sec, puis à l'aide d'une pipette à deux traits également stérilisée, j'y ai prélevé six fois de suite 50^{cm³} que j'ai répartis dans six fioles d'Erlenmeyer renfermant chacune la même quantité de carbonate de calcium précipité pur et stérilisées au four Pasteur à 150°.

J'ai placé les six fioles à l'étuve à 37° et, après avoir vérifié au bout de 48 heures que le contenu des fioles était toujours stérile, j'ai pratiqué l'ensemencement dans les mêmes conditions que pour le glucose. Après 10 jours de séjour à 37° j'ai dosé le lévulose de la même manière que le glucose après avoir déféqué les liqueurs dans les mêmes conditions. J'ai obtenu les résultats suivants :

Lévulose dans 50^{cm³} de milieu.

Milieu témoin.....	1 ^g ,644
Culture de <i>Proteus</i> V.....	0,861
Culture de <i>Proteus</i> M.....	0,447

Ces chiffres ont été calculés en utilisant, ainsi que le conseille M. G. Bertrand, le Tableau qu'il a établi pour le sucre interverti; l'erreur est d'ailleurs négligeable. La quantité de lévulose introduite dans chaque fiole de culture étant la même que pour le témoin, il en résulte que le *Proteus* V a consommé 47,6 pour 100 du sucre mis à sa disposition, tandis que le *Proteus* M en a détruit 72,8 pour 100.

Cette expérience sur le lévulose m'a donné occasion d'observer le fait suivant, sans grande importance, mais qu'il est cependant bon de noter. Comme j'avais un assez grand excédent de milieu lévulosé après avoir prélevé les 300^{cm³} qui m'étaient nécessaires, j'y ai dosé immédiatement le lévulose sur deux prises identiques et j'ai trouvé une quantité de sucre correspondant à 1^g,710 de lévulose dans 50^{cm³}; or, dans le milieu témoin (1), après 10 jours d'étuve à 37°, il n'y avait que 1^g,644 de lévulose. Il y avait donc une perte de 0^g,066 de sucre qu'il est impossible d'attribuer à une erreur dans les dosages, car j'ai analysé les deux témoins et répété au moins deux fois mes déterminations; d'ailleurs j'ai, pour tous les sucres que j'ai examinés, constaté un phénomène analogue. Je pense

(1) Bien entendu, j'ai vérifié que le milieu était rigoureusement aseptique.

que ces légères pertes résultent simplement de l'action prolongée de la peptone pancréatique Defresne, si riche en amino-acides, sur les différents sucres que j'ai étudiés. Maillard a d'ailleurs observé que les peptones, les polypeptides et les acides aminés réagissent sur les sucres non seulement à une température élevée, mais même à 34° (48). Il semble donc qu'il n'y a pas lieu de chercher une autre explication des faits que je viens de signaler et qui n'ont d'ailleurs pas grand intérêt car ils ne peuvent influencer les résultats, les fioles témoins et les fioles de cultures étant soumises aux influences extérieures pendant le même temps et exactement dans les mêmes conditions.

GALACTOSE.

Pour obtenir le galactose nécessaire à mes recherches j'ai opéré, d'après Tollens (49), de la manière suivante : j'ai dissous le produit pur du commerce dans 80 pour 100 de son poids d'eau distillée maintenue à 60° jusqu'à parfaite dissolution; à ce moment j'ai ajouté à la liqueur filtrée de l'alcool à 93° dans la proportion de 160 pour 100 du poids du sucre mis en œuvre. J'ai laissé refroidir et j'ai essoré à la trompe la masse cristalline, puis j'ai soumis celle-ci à un nouveau traitement semblable au premier; j'ai alors purifié le galactose ainsi obtenu par deux nouvelles cristallisations dans l'eau distillée, et c'est le sucre résultant de cette dernière opération que j'ai employé pour mes essais, après l'avoir desséché dans le vide sur l'acide sulfurique.

J'ai préparé mon milieu comme avec le glucose et chaque fiole d'Erlenmeyer contenait exactement la même quantité de galactose dissous à raison d'environ 2,8 pour 100 dans de l'eau peptonée à 2 pour 100; en un mot, toute l'expérience a été calquée exactement sur celle qui concernait le glucose, aussi bien en ce qui regarde la stérilisation et l'ensemencement que le dosage du sucre.

Les résultats ont été les suivants :

Galactose dans 50^{cm}³ de milieu.

Milieu témoin.....	^g 1,286
Culture de <i>Proteus</i> V.....	0,014
Culture de <i>Proteus</i> M.....	0,072

On voit donc qu'en 10 jours à 37°, le *Proteus V* a consommé 98,9 pour 100 du sucre mis à sa disposition, et le *Proteus M* 94,4 pour 100, c'est-à-dire que les deux microbes sont capables d'attaquer le galactose à peu près avec la même énergie.

SACCHAROSE.

Le saccharose dont je disposais titrant déjà 98,66 pour 100, je me suis contenté de le purifier par une méthode simple dont voici la description : j'ai pulvérisé finement le sucre, puis je l'ai traité par l'alcool à 85° employé en quantité exactement suffisante pour le dissoudre à la température de 70° et quand la dissolution a été achevée j'ai filtré, j'ai laissé refroidir complètement la liqueur, j'ai essoré la masse cristalline; j'ai repris celle-ci encore une fois par l'alcool à 85° de manière à tout dissoudre à 70°, et ensuite j'ai additionné la solution de son volume d'alcool absolu. Après avoir bien agité j'ai abandonné le mélange au repos pendant 24 heures, j'ai essoré la masse cristalline qui s'était déposée et je l'ai lavée à l'alcool absolu. Enfin j'ai fait sécher les cristaux de sucre à l'air libre d'abord, puis dans le vide sur l'acide sulfurique.

Pour titrer le sucre ainsi obtenu j'ai suivi la technique indiquée par M. G. Bertrand : j'ai pesé exactement 4^g,75 du sucre sec et je l'ai mis dans une fiole conique avec 50^{cm³} d'eau distillée, j'ai ajouté 1^{cm³} d'acide chlorhydrique et, après complète dissolution, j'ai plongé la fiole dans de l'eau bouillante que j'ai maintenue à l'ébullition pendant 15 minutes. Après refroidissement j'ai neutralisé exactement la liqueur sucrée avec de la soude et à l'aide du tournesol, et je l'ai versée dans un ballon jaugé de 1 litre, en rinçant la fiole à plusieurs reprises et en réunissant les eaux de lavage dans le ballon. J'ai rempli celui-ci avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge, en ayant soin de rendre la solution parfaitement homogène. Tout le sucre étant interverti, j'ai prélevé, avec une pipette à deux traits, 10^{cm³} de la liqueur sucrée que j'ai mis dans une fiole conique de 150^{cm³} avec un égal volume d'eau distillée, et, en procédant suivant la technique habituelle, j'ai eu finalement une quantité de sulfate ferreux qui a exigé 9^{cm³},2 de la solution de permanganate de potassium à 5^g,15 par litre. Le calcul m'a donné

une teneur en saccharose de 99,71 pour 100, teneur vérifiée par un second dosage.

J'ai fait le milieu et j'ai conduit l'expérience exactement comme pour le glucose.

Au bout de 10 jours d'étuve à 37° j'ai déféqué le témoin de manière à obtenir 500^{cm³} de liqueur et les cultures de manière à obtenir 250^{cm³} pour ne pas trop diluer les liqueurs sucrées.

Des essais préliminaires m'ayant montré que le sucre restant dans les cultures était hydrolysé seulement en partie, j'ai fait deux séries de dosages : le premier avant hydrolyse pour connaître la quantité de saccharose hydrolysé par le *Proteus* et le second après hydrolyse pour doser le sucre en bloc, ce qui était pour moi la donnée la plus importante.

Avant l'hydrolyse les résultats ont été les suivants :

Sucre interverti par 50^{cm³} de milieu.

Milieu témoin	^g 0,005
Culture de <i>Proteus</i> V	0,231
Culture de <i>Proteus</i> M	0,146

Le dosage de la petite quantité de sucre interverti donnée par le témoin n'est peut-être pas absolument exact parce que, ce sucre se trouvant en solution très étendue, la méthode est moins rigoureuse. Quoi qu'il en soit, le saccharose employé ne réduisant absolument pas la liqueur cuivrique alcaline, cette petite interversion est due vraisemblablement à l'action de l'eau, de la peptone et des acides aminés sous l'influence de la haute température de la stérilisation et du séjour à l'étuve. On voit en somme que les deux *Proteus* sécrètent une sucrase, le *Proteus* V étant plus actif à cet égard que le *Proteus* M.

Après hydrolyse, les résultats calculés en saccharose ont été :

Saccharose par 50^{cm³} de milieu.

Milieu témoin	^g 1,413
Culture de <i>Proteus</i> V	0,259
Culture de <i>Proteus</i> M	0,467

Le *Proteus* V a donc détruit 81,6 pour 100 de la quantité de saccharose dont il disposait et le *Proteus* M seulement

66,8 pour 100. Du saccharose non détruit le *Proteus* V a interverti 85 pour 100 et le *Proteus* M 30 pour 100. Il semble du reste assez probable que les deux *Proteus* ne détruisent le saccharose qu'après l'avoir préalablement hydrolysé.

LACTOSE.

Le lactose pur du commerce que je possédais titrait seulement 96,59 de sucre à une molécule d'eau; je n'ai donc pu l'utiliser tel quel et je l'ai purifié par deux cristallisations dans l'eau. Pour cela je l'ai dissous dans trois fois son poids d'eau distillée chaude; j'ai ajouté à la liqueur un peu de noir animal lavé et je l'ai maintenue au bain-marie bouillant pendant une demi-heure en agitant fréquemment. J'ai alors filtré cette solution que j'ai abandonnée à elle-même pendant 24 heures; j'ai essoré les cristaux qui s'étaient déposés et je les ai redissous également dans trois fois leur poids d'eau bouillante en laissant le mélange au bain-marie jusqu'à dissolution complète. J'ai ainsi obtenu une liqueur parfaitement limpide que j'ai abandonnée au refroidissement jusqu'au début de la cristallisation; à partir de ce moment j'ai agité très souvent la fiole qui la contenait afin d'obtenir des cristaux de très petite taille; je les ai laissés se rassembler jusqu'au lendemain, je les ai essorés à la trompe, puis lavés avec à peu près trois fois leur poids d'alcool à 50°. J'ai laissé sécher à l'air et à l'abri de la poussière la poudre cristalline ainsi obtenue et enfin je l'ai maintenue dans le vide, sur l'acide sulfurique, jusqu'à poids constant. Le sucre résultant de ces diverses opérations titrait alors 99,25 pour 100 de lactose à une molécule d'eau de cristallisation.

J'ai préparé le milieu avec de l'eau peptonée comme pour les autres sucres et j'ai conduit l'expérience exactement de la même manière. Le milieu témoin et les cultures des deux *Proteus* sont restés côte à côte à 37° pendant 10 jours au bout desquels je les ai sortis de l'étuve. J'ai pratiqué les dosages comme d'habitude, mais comme des essais antérieurs m'avaient montré que la quantité de lactose consommée par les microbes était très petite, j'ai amené au volume de 500^{cm}³ les trois liqueurs déféquées à examiner.

Ainsi que l'ont fait remarquer MM. G. Bertrand et G. Weissweiler dans un cas semblable (50), il se présente ici une difficulté

qui est, actuellement, pratiquement insurmontable; elle porte sur le dosage du lactose restant, parce que celui-ci se trouve en présence d'autres sucres réducteurs, le glucose et le galactose qui résultent de son hydrolyse par les microbes.

Avant tout, en mesurant le pouvoir réducteur des cultures après défécation, avant et après hydrolyse par l'acide chlorhydrique, je me suis assuré qu'il restait encore du lactose intact, parce qu'après l'hydrolyse le pouvoir réducteur était plus grand.

Ce qui est le plus intéressant ce n'est pas de savoir si les microbes hydrolysent plus ou moins profondément le lactose, mais bien la quantité de cette substance détruite par eux pour former des composés qui ne sont plus des sucres (acide lactique, acétique, etc.); c'est pourquoi je me suis contenté de doser les substances réductrices en bloc après hydrolyse complète. En ramenant au lactose, par le calcul, les quantités ainsi trouvées et en comparant avec le témoin, on se fait une idée approchée de la proportion de sucre de lait transformée. Je dis approchée parce que les procédés actuels de dosage ne permettent dans ce cas que des approximations : quand on détermine la quantité de cuivre qui a été réduit, pour en déduire la teneur en matière sucrée de l'échantillon analysé, il faut en effet connaître la nature du sucre en cause, pour chercher dans les tables de G. Bertrand quelle quantité de substance réductrice lui correspond; or, dans le cas qui m'occupe, même après hydrolyse, on se trouve en présence d'un mélange de sucres (glucose et galactose), et ce n'est forcément que le pouvoir réducteur global qu'on utilise comme base des calculs.

J'ai donc hydrolysé aussi bien la liqueur fournie par le témoin que celles résultant des cultures. Pour cela je me suis conformé aux indications données par G. Bertrand et G. Weissweiler (*loc. cit.*) qui ont constaté qu'il suffit de porter la liqueur déféquée à l'ébullition après l'avoir additionnée d'acide chlorhydrique à 22 B. employé à la dose de 1^{cm³} pour 20 de liquide sucré, l'ébullition devant être maintenue 45 minutes. Il est nécessaire également de placer un petit réfrigérant ascendant au-dessus du ballon dans lequel on fait l'hydrolyse afin de maintenir constant le volume de la liqueur; celle-ci est abandonnée au refroidissement lorsque l'opération est terminée, puis neutralisée exactement avec la

soude, amenée à un volume connu et filtrée pour séparer le précipité d'hydrate de zinc; c'est sur la solution limpide ainsi obtenue qu'on détermine le pouvoir réducteur. Dans ces conditions j'ai trouvé les résultats suivants :

Lactose pour 50^{cm}³ de milieu.

	Lactose	
	hydraté.	anhydre.
Milieu témoin.....	^g 1,436	^g 1,364
Culture de <i>Proteus</i> V.....	1,390	1,321
Culture de <i>Proteus</i> M....	1,333	1,263

Ainsi que je le fais remarquer plus haut ces résultats ne sont qu'approchés, toutefois ils sont suffisants pour le but que je poursuivais puisqu'ils montrent que le sucre de lait est attaqué, faiblement il est vrai, mais assez cependant pour qu'il ne puisse y avoir de doute. La proportion du lactose disparu est en effet de 3,1 pour 100 pour le *Proteus* V et de 7,4 pour 100 pour le *Proteus* M.

Le *Proteus* attaque donc le lactose contrairement à ce qu'affirment la plupart des auteurs qui se sont occupés de ce microbe. Toutefois, ainsi que je vais le montrer, cette divergence entre les résultats de leurs recherches et ceux des miennes est plutôt apparente que réelle.

En effet les bactériologistes qui ont examiné l'action saccharolytique du *Proteus* ont presque tous opéré qualitativement et se sont bornés à observer les changements de réaction produits par ce microbe dans les milieux sucrés; le *Proteus* étant un énergique producteur d'ammoniaque et d'amines, on conçoit aisément qu'une recherche peu approfondie puisse laisser l'attaque du lactose inaperçue puisqu'elle est en somme assez faible. Je l'ai vérifié en faisant des cultures en milieu lactosé non carbonaté; celles-ci se sont montrées alcalines, pour les deux variétés V et M, même au bout de 10 jours d'étuve. Un exemple encore plus suggestif, au même point de vue, m'a été fourni par des cultures réalisées dans des conditions identiques sur eau peptonée lévulosée, sans carbonate de calcium; le *Proteus* M qui détruit à peu près les trois quarts du lévulose en présence de CO³Ca acidifie bien le

milieu non carbonaté, mais le *Proteus* V, qui consomme pourtant environ la moitié du lévulose mis à sa disposition dans le milieu additionné de carbonate de calcium, laisse alcaline la réaction des cultures en eau peptonée lévulosée sans CO^3Ca . Il faut donc opérer quantitativement si l'on veut mettre en évidence d'une façon indiscutable l'action du *Proteus* sur certains sucres.

Parmi les auteurs qui n'ont examiné leurs cultures que qualitativement je n'ai trouvé que L. Gaillard (51) qui ait observé l'attaque du sucre de lait, mais les divers caractères biochimiques de l'unique germe décrit par lui comme consommant le lactose sont si différents de ceux que l'on observe communément, qu'il est difficile de mettre les propriétés qu'il a observées en opposition avec celles que tous les autres bactériologistes attribuent au *Proteus vulgaris*.

Pour ma part, je le répète, avec mes deux *Proteus*, mais seulement en opérant quantitativement, j'ai toujours observé l'attaque du lactose; j'ai même constaté, comme on le verra plus loin, une augmentation assez remarquable de la faculté d'attaquer ce sucre en faisant subir à mes deux microbes des passages sur la viande cuite et dans l'organisme du cobaye. Toutefois je tiens à faire remarquer que, pour affirmer d'une façon indiscutable la constance de cette propriété biochimique du *Proteus*, il faudrait étudier quantitativement un grand nombre d'échantillons d'origines très diverses, ce qui représenterait un travail considérable pour un résultat relativement peu important et tout à fait en dehors de mon travail, puisque je désire seulement comparer deux variétés isolées dans des conditions fort différentes.

Dans les applications courantes de la bactériologie à la clinique l'emploi des dosages pour la diagnose rapide des espèces est irréalisable. Il en est de même d'ailleurs dans les recherches d'ensemble, soit qu'il y ait un trop grand nombre d'échantillons à étudier, soit qu'il faille s'en tenir aux procédés employés par la généralité des auteurs; on en a l'exemple dans l'étude des caractères biochimiques du *Proteus* publiée par A. Berthelot et que j'ai déjà signalée, étude dont l'auteur montre les inconvénients de la méthode qualitative qu'il a été forcé d'adopter à regret, pour que les résultats de ses nombreux essais soient comparables avec ceux de ses prédécesseurs, et dans laquelle il indique les précau-

tions que l'extrême variabilité des pouvoirs alcaligène et acido-gène du *Proteus* rend indispensables dans l'examen de son action sur les sucres.

MALTOSE.

Le maltose que j'ai employé a été préparé en recristallisant trois fois dans l'alcool à 80° et deux fois dans l'eau le produit pur du commerce. J'ai préparé mon milieu de culture maltosé dans les mêmes conditions que les autres milieux sucrés; il était neutre au tournesol et j'ai mis à peu près 1^g de carbonate de calcium pur précipité dans chacune des six fioles. Après 10 jours de culture à l'étuve à 37° j'ai pratiqué la défécation comme d'habitude et amené les trois liqueurs à doser au volume de 500^{cm³}.

Des essais préliminaires, faits avec et sans intervention, m'ayant montré que dans les cultures coexistaient du maltose et du glucose résultant de l'hydrolyse du premier, j'ai hydrolysé les trois solutions à analyser de manière à n'avoir à doser que du glucose. Un poids donné de ce sucre correspondant au même poids de maltose à une molécule d'eau (maltose ordinaire), j'ai déterminé ainsi très facilement la proportion de sucre détruit.

Pour hydrolyser chacune des liqueurs à essayer j'en ai versé 20^{cm³} dans une fiole d'Erlenmeyer; après addition de 6^{cm³} d'acide sulfurique au dixième, j'ai adapté la fiole à un réfrigérant ascendant et j'ai porté le liquide à l'ébullition que j'ai maintenue pendant 2 heures. Après refroidissement j'ai neutralisé et j'ai fait les dosages à la manière habituelle.

En tenant compte que l'hydrolyse ne donne que 98,6 pour 100 de glucose (Tollens) les résultats obtenus sont les suivants :

Maltose à 1^{mol} d'eau ou glucose pour 50^{cm³} de milieu.

Milieu témoin.....	1,432
Culture de <i>Proteus</i> V.....	0,457
Culture de <i>Proteus</i> M.....	1,432

Le *Proteus* V a donc consommé 68,1 pour 100 de maltose, mais le *Proteus* M n'a pas attaqué ce sucre, bien que la culture ait été aussi abondante que pour la variété V. Un nouvel essai dans les mêmes conditions m'a donné des résultats identiques, mais,

ainsi qu'on le verra plus loin, j'ai constaté que des passages, sur viande stérile ou dans l'organisme du cobaye, se sont montrés capables de modifier les propriétés du *Proteus* M à l'égard du maltose. Toutefois le pouvoir saccharolytique qui est apparu dans ces conditions s'est toujours montré beaucoup plus faible que celui du *Proteus* V.

Appendice à l'action sur les hydrates de carbone.

GLYCÉRINE.

J'ai employé la glycérine pure du commerce, sans me préoccuper de la quantité de propanetriol qu'elle contenait parce que, en admettant comme quantité existant dans le milieu avant la culture la quantité retrouvée dans le témoin, les résultats pour 100 seront les mêmes que si je connaissais exactement la quantité de glycérine vraie introduite.

Le milieu était identique à celui qui m'a servi pour les sucres, neutre au tournesol, et contenait à peu près 5 pour 100 de glycérine; j'en ai mis 50^{cm³} dans chaque fiole contenant 1^{re} environ de carbonate de calcium pur et tamisé. J'ai stérilisé pendant une demi-heure à la température de 115°, j'ai mis les six fioles à l'étuve à 37° pendant 24 heures et, après avoir vérifié la stérilité du milieu, j'en aiensemencé deux avec le *Proteus* V et deux autres avec le *Proteus* M, les deux dernières étant conservées comme témoins, j'ai replacé les six fioles dans l'étuve à 37° où je les ai laissées pendant 10 jours. Chaque jour je les agitais soigneusement en constatant les progrès des cultures et la stérilité des témoins. Le dixième jour, après avoir observé encore une fois que les témoins étaient stériles, j'ai enlevé de l'étuve les six fioles, mettant en réserve les doubles et conservant les autres pour les dosages.

J'ai pratiqué ceux-ci d'après le procédé que M. E. Bertainchand a décrit pour le dosage dans les vins (52) avec les modifications imposées par la nature des liqueurs que je devais analyser.

Le contenu de chacune des fiolesensemencées et de la fiole témoin a été traité par un excès d'eau de baryte, puis filtré. Le précipité a été lavé à plusieurs reprises; les eaux de lavage réunies

au filtrat respectif ont été traitées par un excès de sulfate de sodium pur et filtrées. Ce nouveau précipité a été lavé à plusieurs reprises, et le filtrat ainsi obtenu a été complété à 250cm^3 . J'ai prélevé 50cm^3 de chaque liqueur pour les soumettre parallèlement toutes les trois au même traitement. J'ai concentré ces prises d'essai dans des capsules de porcelaine placées au bain-marie, et de manière à ne jamais dépasser 60° . Au résidu sirupeux j'ai ajouté, en mélangeant bien soigneusement, 10^8 de sulfate de sodium pur anhydre et pulvérisé, puis j'ai introduit chacun des trois mélanges dans un ballon de 100cm^3 , rempli à plus de trois quarts avec une liqueur composée de quatre volumes d'éther acétique purifié et d'un volume d'alcool absolu. Après avoir rincé à fond les capsules avec cette même liqueur, j'ai chauffé les trois ballons pendant 1 heure à une température de 50° - 60° en agitant fréquemment. Après refroidissement à 15° j'ai complété à 100cm^3 avec le même mélange acététhyl-alcoolique, j'ai bien agité, j'ai filtré et prélevé de chacune des trois liqueurs claires 50cm^3 que j'ai évaporés à une température de 50° - 60° au bain-marie, dans des flacons tarés à large ouverture. J'ai poussé l'évaporation jusqu'à la consistance de sirop, puis j'ai continué la dessiccation dans le vide sur l'acide sulfurique jusqu'à poids constant.

Ayant ainsi déterminé, avec toute la précision possible, le poids des trois vases à extrait, je les ai complètement débarrassés de glycérine en les traitant à cinq reprises et très soigneusement, par un mélange à volumes égaux d'alcool et d'éther acétique purifié. J'ai alors placé dans l'étuve à 60° les trois vases ne contenant plus que le très faible résidu laissé par la liqueur éthéro-alcoolique, puis je les ai maintenus dans le vide sulfurique jusqu'à poids constant. Je les ai portés encore une fois à la balance et, par différence avec les premiers poids (avec la glycérine), j'ai déterminé les quantités de cette substance que contenaient les trois prises d'essai.

Pour les calculs j'ai tenu compte que j'ai employé le cinquième de chaque liqueur déféquée, donc le cinquième du total de chaque fiole; les 10^8 de sulfate de sodium anhydre employés ayant un volume réel de $3\text{cm}^3,8$, celui du solvant était donc $96\text{cm}^3,2$ et j'en ai évaporé 50cm^3 ; par le calcul il m'a été facile d'établir ce que représentaient les 50cm^3 de liqueur et par conséquent la teneur exacte en glycérine des trois échantillons.

J'ai ainsi obtenu les résultats suivants pour le total de chaque fiole.

Glycérine pour 50^{cm}³ de milieu.

Milieu témoin.....	2,26 ^g
Culture de <i>Proteus</i> V.....	1,67
Culture de <i>Proteus</i> M.....	1,15

Le *Proteus* V a donc détruit 26 pour 100 de la glycérine qu'on lui a offert et le *Proteus* M 49,1 pour 100.

Avec les doubles des deux cultures j'ai constaté la réduction à froid de la liqueur de Fehling, le témoin étant, bien entendu, sans aucune action sur cette liqueur. Cette réduction est certainement due à la présence de dioxycétone $\text{CH}^2\text{OH} - \text{CO} - \text{CH}^2\text{OH}$ résultant de l'oxydation de la glycérine. Cette formation de dioxycétone par oxydation microbienne de la glycérine a été observée pour la première fois par M. Gabriel Bertrand avec la bactérie du sorbose; elle est même telle que cet auteur a pu établir qu'il n'y avait pas pratiquement de meilleure méthode de préparation de la dioxycétone que de cultiver sur des milieux glycélinés la bactérie dont il a montré les si remarquables propriétés biochimiques (53). Depuis, M. A. Fernbach (54) a observé un phénomène analogue dans les cultures de *Tyrothrix tenuis*. Je me réserve de reprendre ultérieurement l'étude de cette propriété du *Proteus*; je tenais simplement à la signaler, car aucun auteur ne semble l'avoir observée. Étant données les affinités déjà connues des actions chimiques du *Proteus* et du *Tyrothrix*, il n'est pas étonnant que ces deux espèces microbiennes se comportent de même à l'égard de la glycérine.

MANNITE.

J'ai étudié également, dans les mêmes conditions, l'action de mes deux *Proteus* sur la mannite, mais en raison de l'inexactitude du procédé de dosage, les résultats que j'ai obtenus n'ont que peu de valeur et je ne les donne qu'à titre de simple indication.

Le *Proteus* V a consommé 7,6 pour 100 de la mannite mise à sa disposition, tandis que le *Proteus* M s'est contenté de 4,2 pour 100. On doit admettre en tout cas, comme faits certains, que les *Proteus* M et V se développent bien sur les milieux à la mannite

et que s'ils attaquent cet alcool ce n'est que bien peu activement. Enfin ni l'une ni l'autre de mes cultures mannitées ne réduisirent à froid la liqueur de Fehling, ainsi que le font celles de quelques microbes, comme le *Tyrothrix tenuis*, le *Bacillus subtilis* et le *B. mesentericus vulgaris* par exemple.

Pour terminer ce qui concerne les hydrates de carbone je dois ajouter que j'ai aussi expérimenté avec le mannose, mais comme je ne disposais que d'une très petite quantité de ce sucre et que celui-ci (produit *pur* de Kahlbaum!) ne titrait que 91,8 pour 100, je n'accorde que peu d'importance aux résultats que j'ai obtenus. Leur seul intérêt réside dans ce fait que le *Proteus V* ne prendrait que 11,2 pour 100 du mannose qui lui a été offert, tandis que le *Proteus M* en consommerait 99,3 pour 100.

II. — ACTION SUR LES MATIÈRES PROTÉIQUES ET LEURS DÉRIVÉS.

GÉLATINE.

J'ai employé comme gélatine la sorte commerciale que l'on utilise habituellement dans les laboratoires de bactériologie. Mon milieu présentait la composition suivante :

Gélatine.....	100 ^g
Phosphate bipotassique sec.....	2 ^g
Sulfate de magnésium cristallisé.....	1 ^g
Chlorure de calcium cristallisé.....	0 ^g , 02
Acides aminés de l'hydrolyse chlorhydrique de la caséine..	5 ^g
Eau distillée, q. s. p.....	1 ^l

Pour le préparer j'ai mis la gélatine dans une marmite avec de l'eau, j'ai ajouté les autres substances, et j'ai maintenu au bain-marie bouillant jusqu'à complète dissolution de la gélatine. La liqueur bien chaude, neutralisée à la soude, a été alors filtrée au papier Chardin. J'ai agité le milieu ainsi obtenu pour le rendre bien homogène, puis je l'ai distribué par portions de 100^{cm}³ dans six fioles coniques de 250^{cm}³, que j'ai bouchées au coton cardé et coiffées d'un capuchon en papier à filtrer. Je les ai stérilisées deux jours de suite pendant 20 minutes à 100° à l'autoclave ouvert.

Après 48 heures de séjour à 37°, ayant vérifié que toutes les fioles étaient stériles, j'en ai ensemencé quatre avec les deux *Proteus*, et je les ai placées, à côté des fioles témoins, à l'étuve à 37° où elles sont restées pendant 15 jours. Chaque fiole était agitée tous les jours. J'ai analysé en même temps le contenu d'une fiole témoin et celui d'une de chaque microbe, les doubles étant mises en réserve à la glacière.

Pour les dosages j'ai procédé de la manière suivante :

J'ai étiqueté trois vases à précipiter de 200^{cm³} et, dans l'un d'eux, j'ai mis 10^{cm³} de milieu témoin mesurés à la pipette à deux traits; j'ai agi de même pour les deux cultures et j'ai additionné chaque prise d'essai de 90^{cm³} d'eau distillée. Après avoir rendu les liquides homogènes au moyen de courts agitateurs, je les ai précipités par un excès de la liqueur suivante soigneusement filtrée :

Alcool à 50°.....	200 ^{cm³}
Acide picrique.....	10 ^g
Formol.....	80 ^{cm³}
Acide acétique.....	20 ^{cm³}

Après avoir mis dans chaque vase un excès de ce réactif et bien agité, j'ai laissé en repos jusqu'au lendemain. J'ai alors filtré chaque liquide sur deux filtres équilibrés placés l'un dans l'autre et, après avoir constaté encore une fois l'absence de précipité dans ce liquide par le réactif picrique, j'ai lavé trois fois (75^{cm³} à chaque reprise) avec le même réactif chaud. Je me suis assuré pour chaque essai que la liqueur qui filtrait chaude ne se troublait pas par le refroidissement. Après quoi j'ai encore lavé vases, filtres et précipités avec de l'alcool à 95°, jusqu'à ce que les liqueurs aient passé incolores, ce qui a demandé un grand nombre de lavages. J'ai alors placé dans l'étuve à 100°-105° les vases à filtration chaude auxquels adhéraient une partie des précipités, leurs agitateurs respectifs, les entonnoirs et les filtres qu'ils supportaient; après 2 heures de dessiccation je les ai placés dans le vide sulfurique jusqu'à poids constant. J'ai noté pour chaque dosage : 1° le poids du vase à précipiter avec son agitateur et son contenu; 2° le poids du précipité recueilli sur le filtre taré. Puis, avec le plus grand soin, j'ai lavé avec de l'eau chaude additionnée de soude chaque vase et son agitateur; je les ai rincés plusieurs

fois à l'eau distillée chaude et je les ai séchés à l'étuve à 100°-105° pendant une demi-heure. Après séjour dans un dessiccateur, sur l'acide sulfurique, j'ai déterminé leur poids qui m'a permis de calculer celui du précipité resté adhérent et par conséquent d'établir celui de la gélatine coagulée dans chaque essai par le réactif picroformolé.

Les résultats ont été les suivants :

Gélatine dans 100^{cm³} de milieu.

Milieu témoin.....	11,90
Culture de <i>Proteus</i> V.....	11,85
Culture de <i>Proteus</i> M.....	1,90

En réalité, la gélatine pesée est à l'état de combinaison avec les réactifs employés, mais les trois dosages ayant été effectués exactement dans les mêmes conditions, les résultats sont sensiblement les mêmes que si j'avais pesé de la gélatine pure. Ils suffisent en tout cas pour montrer que le *Proteus* V attaque à peine la gélatine (0,59 pour 100), tandis que le *Proteus* M détruit 84 pour 100 de cette substance lorsqu'on lui en offre un excès.

ALBUMOSES.

Pour étudier l'action de mes deux *Proteus* sur les albumoses je me suis contenté de les cultiver dans une solution de « peptone de Witte ». J'ai préparé mon milieu en dissolvant 20^g de ce produit dans de l'eau distillée; j'ai neutralisé au tournesol avec de l'acide chlorhydrique étendu (¹), complété à 2 litres et enfin filtré sur papier. J'ai réparti la liqueur dans six ballons d'un demi-litre, à raison de 250^{cm³} par ballon, et je l'ai stérilisée à 115° pendant 20 minutes. J'ai alors placé les six ballons à l'étuve à 37° et, au bout de 24 heures, après avoir vérifié leur stérilité, j'en ai semencé quatre, gardant les deux autres comme témoins. Je les ai mis côte à côte à l'étuve, et c'est dans le témoin et les cultures ayant séjourné 10 jours à 37° que j'ai dosé les albumoses.

(¹) Au contraire de la peptone du Codex qui est neutre et de celle de Defresne qui est acide, la peptone de Witte est alcaline.

Pour cela j'ai prélevé du témoin et des deux cultures 25^{cm³} que j'ai introduits dans des capsules de porcelaine contenant chacune 2^g de magnésie fraîchement calcinée. J'ai placé ces capsules sur un bain-marie bouillant en agitant continuellement pour chasser l'ammoniaque et les amines résultant de la destruction des albumoses (il est clair que dans le témoin il n'y avait pas de protéoses détruites, mais il était indispensable de le soumettre aux mêmes opérations que les cultures). Quand la dessiccation fut aussi complète que possible, j'ai délayé peu à peu le résidu dans 25^{cm³} d'eau distillée et j'ai remis le tout au bain-marie en agitant constamment jusqu'à siccité.

Dans cet extrait j'ai dosé l'azote par le procédé de Kjeldahl de manière à pouvoir calculer le poids de celui qui s'était volatilisé au bain-marie. Pour cela j'ai transvasé dans des ballons spéciaux de 125^{cm³} en verre d'Iéna la matière sèche contenue dans chaque capsule; puis pour entraîner les dernières traces de matières azotées j'ai mis dans chaque capsule vide 1^{cm³} d'eau distillée avec laquelle j'ai lavé avec soin les parois, en m'aidant d'une spatule en platine. Après quoi j'ai ajouté dans chaque capsule 0^g,50 de magnésie calcinée et, au bain-marie, en agitant constamment, j'ai desséché le mélange bien homogène que j'ai réuni à la portion déjà introduite dans le ballon respectif. Dans chacun de ces ballons d'attaque j'ai versé peu à peu et en agitant constamment 20^{cm³} d'acide sulfurique concentré préalablement reconnu exempt d'ammoniaque; j'ai ajouté une gouttelette de mercure, et j'ai placé sur l'ouverture du col de chaque ballon une ampoule sphérique terminée à la partie inférieure par une pointe effilée fermée. J'ai bien agité les ballons et je les ai placés sur une rampe de Debray en les inclinant d'environ 35° à 40° sur la normale. J'ai chauffé doucement de manière à obtenir une ébullition assez faible pour qu'il n'y ait pas de vapeurs à l'extérieur du ballon. J'ai maintenu cette ébullition encore 20 minutes après la décoloration des liqueurs, puis je les ai laissé refroidir jusque vers 70° et j'ai introduit dans chaque ballon en agitant sans cesse de petites parcelles de permanganate de potassium en poudre jusque ce qu'un léger excès de ce sel ait déterminé une faible coloration persistante.

Après quoi, j'ai versé d'un seul coup dans chaque ballon 80^{cm³} d'eau distillée vérifiée exempte d'ammoniaque; les cristaux étant

dissous, j'ai transvasé le contenu de chaque fiole d'attaque dans un grand ballon à fond rond de 1^l,5 en verre de Bohême. A l'aide de trois lavages à l'eau distillée par chaque dosage, j'ai fait passer dans le grand ballon à distillation tout ce qui pouvait rester d'ammoniaque dans la fiole en verre d'Iéna. A ce moment j'ai introduit dans la liqueur sulfurique un léger excès d'hypophosphite de sodium pour assurer la réduction complète du mercure, puis 300^{cm³} d'eau distillée et une petite quantité de ponce en poudre (1). Après refroidissement de la liqueur, j'y ai ajouté d'un seul coup 100^{cm³} de lessive de soude à 36° B. exempte d'ammoniaque et j'ai immédiatement adapté le ballon de distillation à un réfrigérant de Schlœsing-Aubin dans lequel la circulation d'eau était déjà établie et dont le tube abducteur plongeait dans 20^{cm³} d'acide sulfurique cinquième normal (9^g,80 de SO⁴H² par litre) contenus dans un verre à expérience de 375^{cm³} et additionnés d'une goutte de solution d'hélianthine. Ayant ainsi opéré de manière à éviter toute déperdition d'ammoniaque, j'ai distillé en maintenant une ébullition bien régulière jusqu'à ce que j'aie pu vérifier l'absence complète d'ammoniaque dans le liquide qui s'écoulait du réfrigérant. J'ai alors titré à l'aide de la soude cinquième normale l'acide sulfurique non saturé par l'ammoniaque distillée et pour les trois échantillons j'ai obtenu les résultats suivants auxquels il n'y a pas eu lieu de faire subir de correction, car une distillation à blanc m'avait montré que les réactifs étaient rigoureusement exempts d'ammoniaque :

Acide nécessaire pour saturer AzH³ de 25^{cm³} de milieu.

	SO ⁴ H ² $\frac{N}{5}$.
	cm ³
Milieu témoin.....	12,85
Culture du <i>Proteus</i> V.....	12,1
Culture du <i>Proteus</i> M.....	12,4

En prenant pour les calculs

$$H = 1, \quad Az = 14, \quad \text{albumoses} = Az \times 6,25,$$

(1) Préalablement calcinée au rouge dans un creuset de platine.

ces quantités rapportées à la totalité de chaque culture, correspondaient à :

	Ammoniaque.	Azote.	Albumoses	
			non détruites.	utilisées par les <i>Proteus</i> .
Témoin.....	0,4369	0,3598	2,249	»
Culture du <i>Proteus</i> V..	0,4114	0,3388	2,117	0,132
Culture du <i>Proteus</i> M..	0,4216	0,3472	2,170	0,079

Le *Proteus* V a donc utilisé 5,8 pour 100 des albumoses mises à sa disposition et le *Proteus* M 3,5 pour 100.

Acides aminés.

Pour étudier l'action du *Proteus* sur les acides aminés j'ai employé que le glycocolle, l'alanine, l'acide aspartique et le tryptophane. Les cultures obtenues avec ce dernier n'ont été examinées qu'au point de vue de la formation d'indol et de l'acide indol-3-acétique.

GLYCOCOLLE.

Je n'ai pu obtenir de culture de mes deux *Proteus* avec un milieu renfermant 2 pour 100 de glycocolle, 0,2 pour 100 de phosphate bipotassique, 0,1 pour 100 de sulfate de magnésium cristallisé et 0,02 pour 100 de chlorure de calcium cristallisé. En portant à 4 pour 100 la proportion de glycocolle le résultat a encore été négatif, et il en a été de même pour une troisième expérience dans laquelle j'ai ajouté 3 pour 100 de glucose et un excès de carbonate de calcium au milieu à 4 pour 100 de glycocolle. Le glycocolle ne convient donc pas à mes deux *Proteus* comme aliment azoté; le produit employé ne peut être mis en cause, car certains microbes voisins du *B. coli* et du *B. lactis aerogenes* l'utilisaient parfaitement comme source de carbone et d'azote.

α -ALANINE.

Dans un premier essai j'ai employé de l'alanine synthétique Kahlbaum; mes *Proteus* ne se sont pas développés dans les milieux

que j'avais préparés avec ce produit. J'ai fait alors une nouvelle expérience avec une alanine naturelle de Schuchardt que j'ai purifiée de mon mieux en la recristallisant trois fois dans l'eau et en rejetant à chaque cristallisation les premiers cristaux formés. Le produit que j'ai finalement obtenu contenait certainement encore de la valine et de la leucine, mais, comme il s'agissait seulement d'étudier comparativement mes deux *Proteus*, je m'en suis contenté et j'ai préparé avec lui le milieu suivant :

α -alanine.....	14 ^g
Phosphate bipotassique.....	1 ^g ,40
Sulfate de magnésium cristallisé.....	0 ^g ,70
Chlorure de calcium cristallisé.....	0 ^g ,010
Eau distillée, q. s. p.....	700 ^{cm³}

Après avoir alcalinisé très légèrement cette solution avec quelques gouttes d'une solution de phosphate tripotassique, je l'ai distribuée par 100^{cm³} dans six ballons de 200^{cm³}. J'ai stérilisé ces six ballons à 115° pendant une demi-heure, puis j'ai vérifié leur stérilité et j'en aiensemencé quatre comme d'habitude; je les ai tous mis côte à côte à l'étuve à 37° pendant 15 jours, après quoi j'ai dosé l'alanine par la méthode de Sørensen en me conformant aux indications données par MM. Gab. Bertrand et Thomas⁽¹⁾.

J'ai d'abord stérilisé les cultures en les maintenant, ainsi que le témoin, une demi-heure à 100°; le volume des milieux ayant notablement diminué pendant ce séjour à l'étuve, je les ai après refroidissement transvasés dans des ballons jaugés de 100^{cm³}-110^{cm³} et j'ai complété à 100^{cm³} en rinçant les trois ballons avec de l'eau distillée. Après avoir rendu les trois liqueurs homogènes j'ai prélevé de chaque 50^{cm³} que j'ai concentrés au bain-marie dans des capsules de porcelaine. Après évaporation de plus de moitié, j'ai ajouté dans chaque capsule 1^g,50 de magnésie fraîchement calcinée, puis en agitant très fréquemment j'ai continué le chauffage au bain-marie jusqu'à siccité.

J'ai alors introduit dans chaque capsule 50^{cm³} d'eau distillée et

(1) Gabriel BERTRAND et Pierre THOMAS, *Guide pour les Manipulations de Chimie biologique*.

après avoir bien remué j'ai exposé au bain-marie jusqu'à dessiccation aussi complète que possible; j'ai pulvérisé, pour chaque capsule, le résidu sec et je l'ai épuisé peu à peu avec de l'eau distillée chaude. J'ai rassemblé les liquides de lavage dans des fioles jaugées de 100^{cm³} surmontées d'un petit entonnoir garni d'un filtre sans plis, puis après refroidissement j'ai complété à 100^{cm³} les trois liqueurs et je les ai soigneusement rendues homogènes.

D'autre part, j'ai préparé 100^{cm³} d'un mélange à parties égales d'eau distillée et de formol du commerce, mélange que j'ai alcalinisé, en présence de phtaléine du phénol, en ajoutant goutte à goutte une solution de soude cinquième normale jusqu'à coloration rose très faible, mais distincte et persistante; puis, pour avoir un étalon de comparaison, j'ai mis dans un vase à précipiter 30^{cm³} d'eau distillée que j'ai amenée, à l'aide de soude très étendue et de phtaléine du phénol, à la même teinte rose que la solution d'aldéhyde formique.

J'ai alors prélevé, avec une pipette à deux traits, 10^{cm³} de chaque liqueur à titrer et, après les avoir versés dans trois vases à précipiter identiques et additionnés de la même quantité de la solution de phtaléine, j'ai amené, avec de la soude, les trois solutions à la même teinte que la liqueur étalon.

A chacune de ces trois solutions j'ai ajouté 20^{cm³} du réactif formolé indiqué ci-dessus. Dans les trois essais devenus incolores j'ai versé goutte à goutte une solution décimale de soude jusqu'à réapparition de la teinte rose primitive qui m'était donnée par l'étalon. La quantité de soude nécessaire pour chacune des liqueurs m'a permis de calculer la teneur en alanine; les résultats ont été les suivants :

	NaOH $\frac{N}{10}$	α -alanine
	pour 5 ^{cm³} de milieu (titrage Sørensen).	dans 100 ^{cm³} de milieu.
	^{cm³}	^g
Milieu témoin..	8,3	1,48
Culture de <i>Proteus</i> V.	8,3	1,48
Culture de <i>Proteus</i> M.	7,8	1,38

Le *Proteus* M a donc utilisé 6 pour 100 de l'alanine mise à sa disposition, tandis que le *Proteus* V, bien qu'il se soit développé,

n'a pas détruit une quantité d'alanine dosable par la méthode de Sørensen.

ACIDE ASPARTIQUE.

Je l'ai employé à l'état d'aspartate de sodium.

Mon milieu contenait, pour 100^{cm³}, 2^g,50 d'aspartate correspondant à 1^g,864 d'acide aspartique. Il avait été préparé avec :

Aspartate de sodium.....	15 ^g ,75
Phosphate bipotassique.....	1 ^g ,26
Sulfate de magnésium cristallisé.....	0 ^g ,63
Chlorure de calcium cristallisé.....	0 ^g ,01
Eau distillée, q. s. p.....	630 ^{cm³}

L'expérience a été conduite exactement dans les mêmes conditions que la précédente.

Le dosage de l'acide aspartique dans le témoin et les deux cultures a été fait de la même manière que pour l'alanine. J'ai obtenu les résultats suivants :

	Na OH $\frac{N}{10}$ pour 5 ^{cm³} de milieu (titrage Sørensen).	Acide aspartique dans 100 ^{cm³} de milieu.
	^{cm³}	^g
Milieu témoin.....	13,2	1,755
Culture de <i>Proteus</i> V.....	12,4	1,649
Culture de <i>Proteus</i> M.....	12,1	1,609

Le *Proteus* V a donc détruit, en quinze jours, 6 pour 100 d'acide aspartique du milieu et le *Proteus* M 8,3 pour 100. Afin de savoir si l'attaque serait plus prononcée au bout d'un temps plus long, j'ai remis à l'étuve à 37° les doubles que j'avais conservés à la glacière; après quinze autres jours j'ai répété les dosages, mais les résultats ont été identiquement les mêmes.

TRYPTOPHANE.

(ÉTUDE DE LA FORMATION D'INDOL ET D'ACIDE INDOL-3-ACÉTIQUE.)

Pour étudier l'action de mes *Proteus* sur le tryptophane j'ai préféré doser la quantité de corps indoliques formés plutôt que la proportion d'aminotryptophane disparu; de cette manière j'ai pu préciser

à nouveau un caractère biochimique intéressant, mais que certains auteurs ont souvent mal interprété. Au cours de ces recherches, j'ai surtout pris pour guide les travaux de M. Louis Gauthier et de M. Albert Berthelot ⁽¹⁾.

Le milieu que j'ai employé avait la composition suivante :

Phosphate bipotassique.....	1 ^g ,50
Sulfate de magnésium cristallisé.....	0 ^g ,75
Chlorure de calcium cristallisé.....	0 ^g ,03
Mélange de produits abiurétiques obtenus par l'hydrolyse acide de la caséine.....	7 ^g ,50
Tryptophane.....	1 ^g ,50
Eau distillée, q. s. p.....	750 ^{cm} ³

L'extrait éthéré des produits d'hydrolyse chlorhydrique de la caséine ne donnait aucune coloration aussi bien avec le *p*-diméthylaminobenzaldéhyde et l'acide chlorhydrique qu'avec le nitrite de potassium et acide sulfurique; par contre, bien que très pur à tous autres égards, le tryptophane contenait une très minime quantité d'indol décelable à l'aide du *p*-diméthylaminobenzaldéhyde, indol dont je l'ai facilement débarrassé en l'épuisant par l'éther dans un appareil de Kumagava.

Après avoir neutralisé mon milieu au tournesol je l'ai réparti par 125^{cm}³ dans des fioles coniques de 250^{cm}³ et je l'ai stérilisé à 115° pendant une demi-heure. Après 24 heures de séjour à 37° et vérification de la stérilité j'ai pratiqué mes ensemencements comme d'habitude, mais j'ai au bout de 5 jours retiré les cultures de l'étuve à 37°. La culture du *Proteus* V était légèrement teintée de jaune, tandis que celle du *Proteus* M était rougeâtre.

Pendant que les *Proteus* se développaient dans le milieu au tryptophane, j'ai purifié l'éther que je destinai aux extractions afin d'éviter les inconvénients signalés par Louis Gauthier (55); j'ai opéré de la façon suivante :

Dans une boule à décantation de 2 litres j'ai introduit 1 litre d'éther pur du commerce et 400^{cm}³ d'eau distillée préalablement additionnée de 20^{cm}³ d'acide sulfurique pur; j'ai agité vigoureusement à plusieurs reprises, puis après séparation et soutirage de la couche aqueuse j'ai à nouveau lavé l'éther avec 400^{cm}³ d'eau dis-

(1) *Loc. cit.*

tillée. Après repos j'ai rejeté celle-ci pour la remplacer par 400^{cm³} d'une solution aqueuse de soude à 10 pour 100 que j'ai agitée violemment avec l'éther; j'ai soutiré la liqueur alcaline et lavé l'éther avec de l'eau distillée jusqu'à ce que celle-ci n'ait plus présenté aucune trace d'alcali, puis j'ai conservé l'éther ainsi purifié et saturé d'eau dans un flacon recouvert de papier noir.

D'autre part, comme réactif, j'ai préparé une solution dont voici la formule :

Paradiméthylaminobenzaldéhyde.....	1 ^g
Alcool à 96°.....	60 ^{cm³}
Acide chlorhydrique pur à 22° B.....	40 ^{cm³}

Avant d'entreprendre des dosages j'ai fait un essai qualitatif; pour cela, après avoir prélevé 25^{cm³} de chacune des cultures et vérifié que les liqueurs étaient alcalines au tournesol, je les ai un peu plus fortement alcalinisées avec quelques gouttes de lessive de soude. Je les ai alors agitées doucement, dans une boule à décantation de 125^{cm³}, avec 25^{cm³} d'éther. Après repos j'ai soutiré la couche aqueuse, j'ai lavé la liqueur éthérée par agitation avec un peu d'eau distillée, et j'y ai recherché l'indol avec le réactif au diméthylaminobenzaldéhyde. Avec l'extrait éthéré de la culture de *Proteus* V, j'ai constaté très nettement la présence de l'indol, mais avec celui de la culture du *Proteus* M je n'ai obtenu aucune coloration. Le *Proteus* M ne produisant absolument pas d'indol dans ces conditions, je n'ai donc eu à analyser quantitativement que la culture du *Proteus* V; mais comme les deux cultures après épuisement par l'éther en milieu alcalin me donnaient, avec le nitrite de potassium et l'acide sulfurique, la réaction caractéristique de l'acide indol-3-acétique, j'ai exécuté en même temps sur les deux prises d'essai V et M le traitement permettant le dosage de l'indol afin de doser l'acide indolacétique dans des liqueurs ayant subi les mêmes opérations. J'ai donc déterminé quantitativement l'indol et l'acide indolacétique de la manière suivante :

Dans une boule à décantation de 250^{cm³} j'ai introduit 100^{cm³} de culture; bien que j'aie vérifié que les liqueurs V et M bleuissaient le tournesol, j'ai, pour chacune d'elles, ajouté une dizaine de gouttes de lessive de soude, puis j'ai commencé l'épuisement en agitant avec 30^{cm³} d'éther purifié comme je viens de l'indiquer. Après

repos j'ai soutiré la couche aqueuse dans une boule à décantation identique et recueilli l'éther dans un flacon recouvert de papier noir. J'ai alors continué l'épuisement en passant d'une boule à l'autre et en employant à chaque fois 20^{cm³} d'éther, ce dissolvant étant à chaque lavage réuni aux portions précédentes dans le flacon couvert de papier; après chaque agitation j'ajoutais quelques gouttes d'alcool pour briser l'émulsion et faciliter la séparation des deux couches. Après neuf épuisements j'ai recherché l'indol sur deux gouttes de l'éther à l'aide du diméthylaminobenzaldéhyde; il y en avait encore, mais au onzième épuisement le réactif ne donnait plus aucune coloration. J'ai conservé la culture épuisée dans la boule où elle se trouvait afin d'en extraire l'acide indolacétique.

J'ai lavé à trois reprises, avec 15^{cm³} d'eau distillée, l'éther chargé d'indol, puis je l'ai introduit dans un ballon à fond rond de 500^{cm³}; j'ai rincé à l'éther la boule à décanter dans laquelle il se trouvait et j'ai ajouté ce dissolvant à la partie que j'avais versée dans le ballon. J'ai adapté celui-ci à un réfrigérant descendant et j'ai distillé l'éther au bain-marie, en évitant soigneusement de dépasser 38°; j'ai poursuivi la distillation jusqu'à ce que tout l'éther ait été chassé du ballon. Ayant vérifié que l'éther qui avait distillé ne renfermait pas d'indol, j'ai versé 400^{cm³} d'eau distillée sur le résidu de la distillation resté dans le ballon et j'ai adapté celui-ci à un réfrigérant descendant; le ballon étant placé sur une toile métallique garnie d'amiant, j'ai distillé en maintenant une vive ébullition jusqu'à ce que la moitié du contenu du ballon ait passé. A ce moment j'ai recherché l'indol sur 1^{cm³} du liquide qui s'écoulait du réfrigérant; ayant constaté qu'il ne donnait aucune coloration avec le réactif au diméthylaminobenzaldéhyde et que par conséquent tout l'indol était entraîné, j'ai arrêté la distillation.

J'ai alors épuisé par l'éther purifié le distillat ainsi obtenu en employant à chaque fois 30^{cm³} de dissolvant et en me servant alternativement de deux boules à décanter; je me suis arrêté au cinquième lavage ayant constaté que tout l'indol avait été enlevé par le dissolvant. J'ai réuni les diverses portions de celui-ci dans une fiole jaugée de 200^{cm³} et, après avoir complété à ce volume par de l'alcool pur, puis agité, j'ai versé la solution éthéro-alcoolique dans un flacon sec entouré de papier noir.

Pour pratiquer le dosage colorimétrique de l'indol j'ai introduit successivement dans un tube à essai bien sec :

1° 5^{cm³} de la solution éthéro-alcoolique provenant de la culture de V ;

2° 4^{cm³} d'alcool absolu ;

3° 6^{cm³} du réactif au diméthylaminobenzaldéhyde + HCl.

Le mélange a pris immédiatement une belle teinte rouge violacé.

Dans un autre tube sec j'ai préparé le mélange étalon suivant :

1° 5^{cm³} d'une solution alcoolique d'indol pur et sec à 1^g d'indol pour 3 litres d'alcool à 96° ;

2° 4^{cm³} d'éther purifié ;

3° 6^{cm³} du réactif.

La coloration de cette liqueur était identique à celle de la précédente.

Après avoir bien agité ces deux solutions colorées je les ai introduites dans les godets d'un grand colorimètre de Pellin, préalablement réglé dans de bonnes conditions d'éclairage. J'ai égalisé les teintes à trois reprises en laissant reposer mes yeux 5 minutes entre les diverses lectures.

J'ai obtenu les chiffres suivants :

Épaisseur de la liqueur étalon	44,5 divisions
Épaisseur de la liqueur V.....	48 »

La quantité d'indol contenue dans les 5^{cm³} de liqueur à analyser est égale à celle contenue dans 5^{cm³} de la liqueur étalon multipliée par $\frac{44,5}{48}$, soit $0,00166 \times \frac{44,5}{48}$ et par conséquent la quantité contenue dans les 200^{cm³} de solution éthérée correspondant à 100^{cm³} de culture est

$$0,00166 \times \frac{44,5}{48} \times \frac{200}{5},$$

c'est-à-dire

$$\frac{0,00166 \times 44,5 \times 40}{48} = 0,0616 \text{ d'indol.}$$

100^{cm³} de milieu contenant 0^g,20 de tryptophane, et 1^g de cet amino-acide donnant 0^g,5735 d'indol, il s'ensuit que le *Proteus* V a transformé en indol 53,7 pour 100 du tryptophane qu'il avait à sa disposition, tandis que le *Proteus* M n'en a pas produit du tout et a limité son action à la formation d'acide indol-3-acétique.

Pour doser celui-ci j'ai acidifié la prise d'essai V, alcaline et épuisée par l'éther, en y ajoutant 10^{cm^3} d'acide sulfurique normal de plus que ce qui était nécessaire pour la neutralisation au tournesol. A l'aide de deux boules à décantation de 250^{cm^3} j'ai alors épuisé cette liqueur par l'éther purifié en employant ce dissolvant par portions de 25^{cm^3} . Après le sixième lavage l'éther n'entraînait plus trace d'acide indol-3-acétique ainsi que je m'en suis assuré à l'aide de AzO^2K et de HCl , d'abord sur deux ou trois gouttes, puis sur le résidu d'évaporation à froid des 25^{cm^3} d'éther de lavage.

J'ai lavé à l'eau distillée le mélange des liqueurs éthérées que j'avais réunies dans un flacon recouvert de papier noir; j'ai chassé l'éther par distillation à aussi basse température que possible, repris par l'alcool à 96° le résidu de cette distillation et complété à 100^{cm^3} .

Après avoir ainsi traité l'essai V j'ai opéré exactement de même avec la liqueur M également alcaline et épuisé par l'éther pour la débarrasser non de l'indol, mais de diverses substances colorantes dérivées du tryptophane.

J'ai donc obtenu ainsi avec elle 100^{cm^3} d'une solution alcoolique M contenant tout son acide indol-3-acétique.

Pour effectuer la détermination colorimétrique j'ai alors préparé les trois mélanges suivants :

I.

	cm^3
1° Liqueur alcoolique V.....	10
2° Solution aqueuse de AzO^2K à $\frac{1}{100}$	3
3° Acide chlorhydrique pur à 22°B	2

II.

	cm^3
1° Solution alcoolique M.....	10
2° Solution aqueuse de AzO^2K à $\frac{1}{100}$	3
3° Acide chlorhydrique pur à 22°B	2

III.

1° Solution alcoolique au $\frac{1}{2000}$ d'acide indol-3-acétique pur desséché dans le vide sur acide sulfurique.....	cm^3 5
2° Alcool à 96°	5
3° Solution aqueuse de AzO^2K à $\frac{1}{100}$	3
4° Acide chlorhydrique pur à 22°B	2

J'ai laissé reposer 15 minutes ces trois liqueurs, puis je les ai examinées au colorimètre.

J'ai obtenu les résultats suivants :

	Culture de <i>Proteus</i> .	
	V.	M.
Acide indol-3-acétique pour 100 ^{cm} ³ de culture.....	0 ^g ,0217	0 ^g ,0800
Poids de tryptophane lui correspondant (en pour 100).....	12,6	46,6

Les deux *Proteus* ont donc bien attaqué le tryptophane. Le *Proteus* M n'a pas formé d'indol dans les conditions que je viens d'exposer, mais a donné de l'acide indol-3-acétique dans la forte proportion de 46,6 pour 100 de la quantité correspondant à l'aminoïque employé; au contraire le *Proteus* V qui a donné une forte proportion d'indol n'a produit que peu d'acide indol-3-acétique : 12,6 pour 100 de la quantité correspondant au poids du tryptophane introduit dans le milieu.

Mes microbes attaquent donc assez différemment le tryptophane au double point de vue qualitatif et quantitatif, ainsi que le montre le Tableau ci-dessous :

	Pour 100.	
	V.	M.
Tryptophane correspondant à l'indol formé.	53,7	0
Tryptophane correspondant à l'acide indol-acétique formé.....	12,6	46,6

Il n'y a cependant pas lieu d'attacher à ces différences une trop grande importance en raison de la variabilité toute particulière du pouvoir indologène du *Proteus*, variabilité amplement établie, ainsi qu'on le verra plus loin, par les recherches de A. Berthelot et les miennes.

Bien entendu, il aurait fallu doser dans les deux cultures l'acide indol-3-carbonique qui y existait en faible proportion; j'aurais dû également tenir compte de la substance colorante très abondante avec le *Proteus* M et qui avait certainement pour origine le tryptophane, car je ne l'ai obtenue que dans les milieux de culture préparés avec cet aminoïque. Mais, comme depuis les travaux de Herter, ce sont surtout l'indol et l'acide indolacétique dont s'occupent les bactériologistes j'ai négligé les autres composés indoliques, produits d'ailleurs en quantités peu importantes.

On m'objectera peut-être que j'aurais pu doser dans mes cultures le tryptophane résiduel. Je ne l'ai pas fait pour deux raisons : la première c'est que je ne disposais que de très petits volumes de liqueur de trop faible concentration pour tenter une détermination pondérale ; la seconde, c'est que le dosage colorimétrique par le *p*-diméthylaminobenzaldéhyde n'aurait donné que des résultats par trop approximatifs, la teinte fournie par les cultures, même épuisées à l'éther et filtrées sur bougie, étant très différente de celle obtenue avec une solution aqueuse de tryptophane. Le point important de mes recherches était surtout de montrer que mes deux *Proteus* attaquaient le tryptophane, l'un très énergiquement, désagrégeant la molécule jusqu'à l'indol, l'autre arrêtant son action au stade acide indolacétique, car aucun microbiologiste, tant soit peu au courant de l'extrême variabilité biochimique de certains microbes et du *Proteus* en particulier, ne saurait voir dans la seule absence ou présence d'indol un caractère suffisant pour classer, dans deux espèces distinctes, deux germes que ne différencieraient pas plusieurs autres caractères biochimiques ou morphologiques plus importants.

La question de la fonction indologène des microbes, même considérée au point de vue spécial du *Proteus*, mérite de retenir particulièrement l'attention, non pas tant par son intérêt pour la distinction des espèces microbiennes, mais surtout parce que l'examen des publications qui la concernent et des discussions qu'elle soulève montre comme il est regrettable que tant de bactériologistes, ignorants des progrès de la Chimie biologique et des principes fondamentaux de l'analyse chimique, s'obstinent à ne pas adopter les méthodes rationnelles que recommandent les chimistes spécialisés dans l'étude des cultures microbiennes.

Lorsqu'il a publié ses recherches sur la production d'indol par le *Proteus*, A. Berthelot a donné de cette question un historique que je crois devoir reproduire en entier avant de montrer combien mes observations confirment celles des microbiologistes qui ont étudié le *Proteus* en mettant à profit les travaux des biochimistes. Voici donc dans quels termes s'exprime cet auteur :

« Ainsi que je le disais au début de ce Chapitre, les bactériologistes qui ont étudié le *Proteus vulgaris* ont généralement négligé

la recherche du phénol dans les cultures de ce microbe. Par contre, toute leur attention s'est portée sur l'indol et, depuis Lewandowski, ils ont toujours considéré la faculté de produire cette substance comme l'un des plus importants caractères du microbe de Hauser. En 1900 Feltz (56) étudia même assez complètement ce point de la biochimie du *Proteus*. Il eut l'heureuse idée de tenir compte des indications de Grimbert (57) sur la variabilité de composition des peptones, et il montra qu'une même race de *Proteus* peut produire de l'indol aux dépens de certaines de ces préparations et ne pas en donner avec d'autres. Ses recherches qui portèrent sur quatre échantillons furent donc faites dans de meilleures conditions que celles de ses devanciers; elles aboutirent à cette conclusion que le *Proteus vulgaris* se comporte toujours en producteur d'indol lorsqu'on le cultive dans un milieu préparé avec une peptone convenablement choisie.

» Deux ans plus tard Tissier et Martelly examinèrent un *Proteus* isolé de viande en putréfaction; ils trouvèrent qu'il produisait de l'indol même dans les cultures sur bouillie de viande.

» La constance du caractère biochimique qui nous occupe semblait assez bien établie lorsqu'en 1906, A. Steensma (58) remarqua que le distillat des cultures de certaines races de *Proteus* ne contenait pas d'indol, alors que les cultures mêmes prenaient une coloration rose par l'addition de nitrite de potassium et d'acide sulfurique.

» On ne prêta pas attention à ces faits pourtant intéressants et cinq ans après Herter et Ten Broeck n'en tinrent aucun compte quand, après avoir examiné seulement deux races, ils publièrent que le *Proteus* cultivé dans une solution de peptone de Witte (1 pour 100) et d'extrait de viande Liebig (0,4 pour 100) produit un peu d'indol et une quantité notable d'acide indolacétique.

» Dans un travail paru à peu près à la même époque que celui de Herter, Cantù considère ce microbe comme un producteur d'indol et, bien qu'il en ait étudié plus de 180 échantillons, il ne dit pas en avoir trouvé qui n'ait pas ce caractère.

» En 1912, Louis Gauthier (59) se basant sur l'examen de deux races, publia que les cultures de *Proteus* dans une solution de peptone pancréatique contiennent toujours de l'indol au bout de 12 heures.

» Enfin quelques mois plus tard, J.-J. van Loghem et J.-C.-W.

van Loghem-Pouw (59), après avoir étudié 30 échantillons, confirmèrent les résultats obtenus par Steensma et crurent bien faire de considérer comme représentants d'une espèce à part, *Bacillus proteus anindologenes*, les *Proteus vulgaris* ne donnant pas d'indol.

» En présence d'une telle confusion, il m'a semblé utile de déterminer, d'une manière aussi précise que possible, quelle est la valeur réelle de la fonction indologène en tant que caractère spécifique du *Proteus vulgaris*. Pour cela, j'ai fait porter mes recherches sur les 61 *Proteus* dont je disposais.

» Avant d'exposer le détail de mes expériences, je crois bon d'insister quelque peu sur les procédés que j'ai employés pour déceler la présence de l'indol dans les cultures microbiennes.

» Jusqu'à ces dernières années, pour caractériser cette substance, les bactériologistes utilisaient généralement une réaction basée sur la formation de nitroso-indol. Cette réaction se pratique le plus souvent suivant la technique adoptée par Kitasato (60) lors de ses premières recherches sur les microbes indologènes, c'est-à-dire qu'à 10^{cm³} de culture en bouillon ou en eau peptonée on ajoute 1^{cm³} d'une solution aqueuse de nitrite de sodium ou de potassium à 0,2 pour 1000, puis quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 22° ou d'acide sulfurique à 66°. Une coloration rouge ou rose indique la présence d'indol; la sensibilité de la réaction peut être accrue en rassemblant dans l'alcool amylique le nitroso-indol formé.

» Bien que ce procédé de recherche soit encore employé très fréquemment, depuis 1901, on tend de plus en plus à lui substituer la réaction d'Ehrlich au *p*-diméthylaminobenzaldéhyde qui est d'une extrême sensibilité (61). Dans les laboratoires de bactériologie on l'effectue généralement en ajoutant, à 10^{cm³} d'une culture en bouillon ou en eau peptonée, quelques centimètres cubes d'une solution alcoolique de diméthylaminobenzaldéhyde à 2 pour 100, puis avec précaution quelques gouttes d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique concentré. Certains expérimentateurs croient utile d'ajouter un persulfate ou un nitrite alcalin ou de faire la réaction à chaud.

» Bien d'autres réactions permettent, comme on le sait, de caractériser l'indol, mais je ne m'en occuperai pas ici, car leur emploi est rarement utile dans le cas qui nous occupe. Je préfère m'en

tenir aux deux que je viens de citer et montrer combien la valeur des résultats qu'elles fournissent dépend des conditions dans lesquelles elles sont effectuées.

» Pendant longtemps on s'est contenté d'ajouter directement aux cultures du nitrite de sodium et de l'acide, puis, pour déceler les très petites quantités d'indol, on eut l'idée de caractériser ce composé non plus dans les cultures même, mais dans leur distillat. Cette manière de faire avait en même temps l'avantage de supprimer une importante cause d'erreur surtout avec les réactifs modernes; avec elle on évitait de pratiquer la recherche de l'indol en présence de certaines substances qui existent dans les cultures et qui peuvent donner lieu à des colorations gênantes. De nombreux auteurs, et notamment Steensma, montrèrent l'intérêt qu'il y avait de préférer à toute autre technique la distillation des cultures; pourtant celle-ci ne méritait guère, ainsi que nous allons le voir, la confiance qu'ils lui accordaient.

» Porcher et Panisset (62) ont établi, en effet, que dans les cultures microbiennes, même d'espèces ne donnant pas d'indol, peuvent se former certaines substances, qui ont comme caractère commun de se décomposer facilement en donnant de l'indol; or l'une d'elles, l'acide indolcarbonique, se dissocie même lorsqu'on porte simplement sa solution aqueuse à l'ébullition. La présence de tels composés indologènes rend donc illusoire la précaution que l'on prenait de distiller les cultures et, pour extraire l'indol qui peut se trouver dans celles-ci, il apparaît indispensable d'avoir recours à d'autres procédés qu'à l'entraînement par la vapeur d'eau. Celui qui convient le mieux est certainement l'épuisement des liquides à analyser par l'éther convenablement purifié.

» Porcher et Panisset ont donc eu le mérite de révéler une grave cause d'erreur dans l'étude de la fonction indologène des microbes et de rappeler en même temps aux bactériologistes qu'on ne doit jamais caractériser directement un corps dans une culture microbienne. Malheureusement leurs conseils n'ont pas été suivis comme ils le méritaient, à tel point que les résultats obtenus par Steensma, en 1906, sont sûrement plus près de la vérité que ceux publiés dans nombre de travaux récents.

» En effet, certains auteurs, ennemis de ce qu'ils appellent dédaigneusement des complications, considèrent comme très suffisant

de rechercher l'indol en pratiquant la réaction d'Ehrlich directement dans les cultures. Pas plus qu'ils ne s'inquiètent des recommandations de Porcher et de Gauthier, ils ne tiennent aucun compte des travaux de nombreux chimistes (63) qui ont montré que le diméthylaminobenzaldéhyde donne avec diverses substances, existant normalement dans la plupart des cultures microbiennes et même dans certains milieux stériles, des colorations très difficiles à distinguer de celles que produisent l'indol et le scatol.

» Il n'est d'ailleurs pas besoin de connaître les travaux que je viens de signaler, pour se rendre compte des précautions qu'impose l'usage du diméthylaminobenzaldéhyde; il suffit de se conduire en expérimentateur consciencieux et de ne pas adopter un réactif aussi sensible sans avoir vu ce qu'il donne avec des milieux témoins. Si les auteurs dont je parle plus haut avaient pris ce soin, ils auraient vu que certains milieux usuels et les solutions de certaines peptones, stériles ouensemencés avec des microbes non producteurs d'indol, donnent, lorsqu'on les traite directement avec le réactif d'Ehrlich, des colorations très variées allant du bleu au rouge groseille en passant par toutes les teintes du violet. Je veux croire qu'en présence de constatations de cette sorte ils n'auraient pas adopté une telle manière de procéder et auraient cherché un moyen d'éviter des causes d'erreur aussi évidentes. Il faut croire toutefois que la nécessité des témoins et des expériences à blanc n'est pas encore admise par tout le monde, car j'ai eu maintes fois l'occasion de voir employer le procédé simpliste dont, après tant d'autres, je viens de montrer les inconvénients (1).

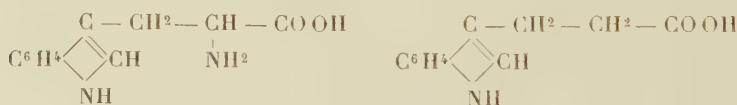
» Quoi qu'il en soit, l'exemple est assez curieux des mauvais résultats que peut donner, lorsqu'elle est utilisée sans précaution, une méthode excellente et très sensible. Il est pourtant bien facile, ainsi qu'on le verra plus loin, d'appliquer correctement la réaction d'Ehrlich et d'en obtenir des résultats ne prêtant guère à discussion. Bien entendu toutes les réserves que je viens de faire ne s'appliquent qu'aux travaux récents et, pour identifier des microbes

(1) On trouvera dans un travail de H. Seidelin et Fr. Lewis [*Some notes on indole-reaction and allied phenomena* (*Journal of Hygiene*, décembre 1911, p. 504)] un exemple des pertes de temps, des incertitudes et des difficultés d'interprétation auxquelles expose la méconnaissance des faits révélés par Neubauer, Cole, Rhode, Porcher, Steensma et Gauthier.

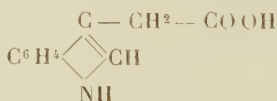
appartenant à des espèces décrites depuis longtemps comme productrices d'indol, il faudra toujours se servir du procédé au nitrite tels que l'utilisaient les anciens auteurs, quitte à compléter ou à corriger leurs observations en faisant des témoins et en employant des méthodes plus rigoureuses.

» Avant d'exposer le détail de mes expériences, il me paraît utile de rappeler brièvement que la production de l'indol par certains microbes est due à leur action sur le tryptophane qui existe dans la molécule de la plupart des albuminoïdes ⁽¹⁾. On en a d'ailleurs une preuve indirecte en cultivant des espèces indologènes fortement protéolytiques dans un milieu où la gélatine représente le seul élément protéique; celle-ci ne renfermant pas de tryptophane on ne trouve pas d'indol dans les cultures.

» Ainsi que l'ont montré Hopkins et Cole (64), la production d'indol et de scatol aux dépens du tryptophane est le résultat d'une attaque progressive au cours de laquelle apparaissent divers corps de plus en plus simples; ces termes de passage sont l'acide indolpropionique, l'acide indolacétique et l'acide indol-carbonique. Depuis que l'on sait définitivement que le tryptophane est l'acide indolaminopropionique on s'explique bien le mécanisme suivant lequel se forment toutes ces substances; comme la tyrosine perd son NH^2 pour donner de l'acide *p*-oxyphénylpropionique, le tryptophane se désamine pour donner de l'acide indolpropionique :

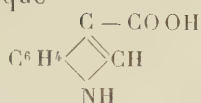


celui-ci se simplifie et donne d'abord de l'acide indolacétique

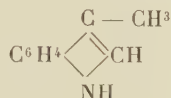


⁽¹⁾ Voir l'excellent article de Ch. PORCHER, *Le tryptophane (Biologie médicale*, juin-juillet 1909). Pour l'étude biochimique de l'indol consulter la Thèse de Ch. HERVIEUX, *Recherches biochimiques sur l'indol (Paris-Sciences*, juin 1908).

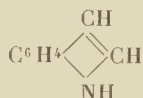
puis l'acide indolcarbonique



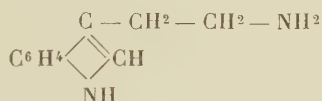
» Ces deux derniers aboutissent alors, par décarboxylation, le premier au scatol



le second à l'indol



» Il est bon de noter en passant que l'action des microbes sur le tryptophane peut se manifester d'une tout autre façon que ci-dessus; en effet, certains microbes s'attaquent immédiatement au carboxyle et de même que la tyrosine donne la *p*-oxyphényl-éthylamine, le tryptophane peut par décarboxylation fournir l'indol-éthylamine



» Enfin, étant donné ce que je viens de rappeler, on conçoit sans peine que les microbes capables d'attaquer le tryptophane, de quelque manière que ce soit, manifesteront beaucoup mieux leur action, lorsqu'ils se trouvent directement en présence de cet acide aminé libre et qu'ils n'auront pas à le séparer d'un édifice moléculaire le plus souvent très complexe.

» Comme on sait que le meilleur procédé de préparation du tryptophane consiste dans la digestion trypsique, aseptique et prolongée de matières albuminoïdes convenablement choisies, on doit donc, pour préparer les milieux destinés à l'étude de la fonction indologène, donner la préférence aux « peptones pancréatiques », particulièrement à celles de caséine. Toutefois, il vaut encore mieux, comme je vais le montrer, employer des milieux de composition bien définie auxquels on incorpore du tryptophane. »

Les expériences que M. A. Berthelot a entreprises pour essayer

de trancher définitivement la question de la production de l'indol par les *Proteus* n'ont pas porté sur moins de 61 échantillons isolés par des bactériologistes comme Metchnikoff et ses élèves D. Bertrand, Cohendy, Fosse, Legroux et Tissier, c'est-à-dire un nombre considérable de microbes dont l'identité avec le *Proteus vulgaris* ne peut être mise en doute et dont il avait vérifié la pureté par cinq isollements successifs. En outre, pour éviter d'avoir à tenir compte de la variabilité des pouvoirs protéolytique, peptolytique et peptidolytique de cette espèce il n'a utilisé que des cultures obtenues avec milieux riches en tryptophane libre (solutions de tryptophane ou solutions de peptone pancréatique de caséine).

Dans ces conditions il a observé que, sur 61 *Proteus*, 24 seulement étaient indologènes, mais que tous produisaient plus ou moins vite, plus ou moins abondamment de l'acide indolacétique caractérisable par les trois réactions suivantes :

1° Avec HCl et AzO^2K , production d'une coloration rose passant complètement dans l'alcool amylique et donnant une bande d'absorption dans le vert;

2° Avec HCl et *traces* de Fe^2Cl^6 , production d'une coloration voisine du rouge cerise;

3° Formation de scatol par chauffage à sec à 210° .

En présence de ces faits A. Berthelot, qui avait constaté sur ses nombreux *Proteus* une grande variabilité biochimique, a pensé qu'il ne devait pas avoir affaire à des représentants d'une race indologène et d'une race non indologène, mais « qu'il devait plutôt s'agir de races différant simplement par une intensité plus ou moins grande de leur action sur le tryptophane ou les substances qui en renferment, action beaucoup trop variable pour que ses divers degrés puissent être utilisés comme caractères différentiels ».

Ses nombreuses expériences, entreprises dans des conditions de milieu très variées et avec un grand nombre de races, lui ont donné le droit de conclure que « le *P. vulgaris* est un microbe qui attaque le tryptophane, par le même mécanisme que les autres aérobies étudiés par Hopkins et Cole, en donnant une série de produits dont la dégradation plus ou moins avancée marque l'intensité de son action sur la molécule aminoïque.

» Dans certaines cultures très âgées, en milieu contenant beaucoup de tryptophane, on peut ne trouver pratiquement que de

l'indol; dans d'autres en général assez jeunes et sur milieu pauvre en tryptophane libre, il n'y a que de l'acide indolacétique, mais ce que l'on rencontre le plus souvent, c'est à la fois de l'indol et de l'acide indolacétique en proportions variables.

» L'action du *Proteus* variant non seulement avec les divers échantillons, mais même pour une race donnée, il est impossible de se baser sur l'absence d'indol dans les cultures de ce microbe pour le différencier des autres espèces. Par contre, et autant que l'on puisse conclure de l'examen de 61 races, on peut dire que tous les *Proteus vulgaris* Hauser sont capables d'attaquer le tryptophane libre et de produire, aux dépens de cet acide aminé, au moins de l'acide indol-3-acétique.

» L'espèce *Bacillus proteus anindologenes* van Loghem n'a aucune raison d'être et l'on doit considérer comme *Proteus vulgaris* Hauser tout microbe possédant, avec les autres caractères de cette espèce, la propriété de donner, à 37°, dans un des milieux que je viens d'indiquer, soit de l'indol ou de l'acide indolacétique, soit un mélange de ces deux corps. »

J'ajouterai que les milieux employés par Berthelot sont faciles à réaliser puisqu'il suffit qu'ils donnent avec l'eau de brome la réaction du tryptophane libre, réaction présentée par toutes les bonnes peptones pancréatiques du commerce.

Malgré le soin avec lequel cet auteur a effectué ses recherches, les faits qu'il a publiés et les indications qu'il a données n'ont point convaincu certains bactériologistes peu au courant des progrès de la Chimie biologique (65). Le premier d'entre eux a été un auteur allemand Hugo Zipfel qui, sans citer le travail publié par Berthelot, en a reproduit les données principales plusieurs mois après, mais en indiquant des méthodes de recherches de l'indol qui ne tiennent aucun compte des corps indologènes accompagnant celui-ci (66).

Le second a été un auteur hollandais E. Baudet qui a étudié au point de vue de l'indol quelques *Proteus* d'origines variées, mais en employant le diméthylaminobenzaldéhyde dans les cultures mêmes ou avec les distillats. Baudet, qui passe sous silence les travaux de L. Gauthier, Porcher, Panisset et Herter, rapporte inexactement les travaux de Berthelot, qu'il critique parce qu'il

n'a pas su comme ce dernier faire produire de l'indol à une race non indologène. Baudet n'est certainement pas chimiste, car il paraît ignorer les termes possibles de la dégradation bactérienne du tryptophane, mais de plus il ne doit guère être au courant de la biologie des microbes pour se figurer que la variation d'une propriété biochimique doit obligatoirement se produire dans les mêmes conditions pour des *Proteus* d'origines différentes (67).

Les plus récentes objections ont été faites par J.-J. van Loghem d'Amsterdam. Cet auteur qui a créé l'espèce *Proteus anindologenes* persiste à la croire nécessaire et il considère comme non avenues les recherches critiques de Berthelot. Si on laisse de côté les arguments tirés des réactions d'agglutination, arguments dont van Loghem reconnaît le peu de valeur, les raisons d'être du *P. anindologenes* seraient : 1° l'absence constante d'indol dans les cultures en solution de peptone de Witte; 2° présence constante dans ces mêmes cultures d'une substance *ne passant pas à la distillation* et donnant avec le nitrite de potassium et l'acide sulfurique une *coloration rouge vineux différente de celle du nitroso-indol*.

En d'autres termes, les *P. anindologenes* de M. van Loghem ne donnent pas d'indol avec la peptone de Witte, mais une substance que cet auteur ne connaît pas et à laquelle il n'attache qu'une faible importance. S'il avait lu attentivement un livre moderne traitant de nos connaissances sur la constitution des albuminoïdes et de leurs produits d'hydrolyse, puis les Mémoires de Porcher, de Panisset, de Hervieux, de L. Gauthier, de Herter, de Fleig, de Herter et Ten Broeck et de A. Berthelot, cet auteur aurait déterminé la nature de cette substance et il aurait vraisemblablement reconnu que ses *P. anindologenes* donnent de l'acide indol-3-acétique. Il est probable que ses conclusions n'auraient pas été les mêmes, qu'il aurait admis celles de A. Berthelot et qu'il n'aurait pas écrit ce qui suit : « Au point de vue biologique nous considérons l'impuissance constante de notre bacille anindologène de séparer de l'indol de cet édifice moléculaire très complexe : la peptone, comme beaucoup plus importante que le fait qu'on peut trouver de temps en temps de l'indol dans des cultures qui contenaient d'avance déjà le tryptophane ou d'autres substances peu complexes (68) ».

Tant que van Loghem n'aura pas avec ses microbes anindologènes répété toutes les expériences de Berthelot, en particulier celles sur la variation du pouvoir indologène suivant le milieu et obtenu des résultants différents, personne ne pourra prêter attention à ses revendications au sujet du *P. anindologenes*.

La confusion ne cessera de régner dans les travaux de bactériologie qu'avec l'adoption de méthodes rationnelles. Il est indispensable que les bactériologistes désireux d'entreprendre des recherches biochimiques prennent la peine de se mettre au courant de l'état actuel de nos connaissances sur la constitution des aliments qu'ils offrent à leurs microbes et de leurs dérivés possibles; il est nécessaire également qu'ils appliquent dans leurs expériences les principes fondamentaux de l'analyse chimique et les indications techniques qui leur sont données par des spécialistes. A notre époque il est impossible de discuter sur le pouvoir indologène quand on ignore d'où vient l'indol formé par les microbes, ce que c'est que le tryptophane et quels sont les produits de sa destruction bactérienne.

Pour ma part je me refuse à considérer le *Proteus M* comme une espèce anindologène distincte; cultivé en présence de peptone de Witte il ne donne pas d'indol et produit le corps non défini par M. van Loghem; mais comme ce corps est de l'acide indol-acétique et que ce *Proteus M* isolé par M. Metchnikoff est justement un des microbes non indologènes auxquels A. Berthelot a fait produire de l'indol après quelques passages sur tryptophane, j'adopte pleinement les conclusions de ce dernier auteur, conclusions qui sont d'ailleurs les mêmes que celles de Herter et Ten Brœck. D'ailleurs, comment pourrais-je classer parmi les espèces anindologènes un microbe qui, s'il ne donne pas d'indol sur les milieux usuels, en produit des traces, comme je l'ai établi plus haut, lorsqu'on le cultive dans un milieu où 1 pour 100 de tryptophane constitue le seul aliment organique?

Appendice à l'action sur les matières protéiques et leurs dérivés.

PEPTONE DE SOIE.

On trouve dans le commerce sous le nom de *peptone de soie* un produit obtenu par l'hydrolyse ménagée de la soie à l'aide des acides minéraux et contenant une très forte proportion de glycyl-tyrosine. Lorsqu'on fait agir, sur les solutions concentrées de ce produit, un enzyme capable de dédoubler le peptide de tyrosine, cet amino-acide se dépose en cristaux d'aspect caractéristique; pensant que le *Proteus* pouvait provoquer un tel dédoublement, j'ai fait quelques essais sur un milieu présentant la composition suivante :

Eau distillée.....	100,00
Peptone de soie Hofmann La Roche.....	2,00
Phosphate bipotassique sec.....	0,20
Sulfate de magnésium cristallisé.....	0,10
Chlorure de calcium cristallisé.....	0,02

Avec 2 pour 100 de peptone les *Proteus* ne se sont sensiblement pas développés; avec 4 pour 100 ils ont donné une bonne culture, mais sans formation de cristaux de tyrosine après 10 jours à 37°; avec 10 pour 100 de peptone les *Proteus* ont parfaitement poussé, mais même après 10 jours d'étuve à 37° et refroidissement des cultures, après amorçage avec une trace de tyrosine cristallisée, il n'y a pas eu de cristallisation.

Enfin, dans un essai avec 20 pour 100 de peptone il n'y a pas eu de développement microbien.

III. — INFLUENCE DES VARIATIONS DE MILIEU SUR LES PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES.

Lorsque les recherches que je viens d'exposer furent terminées, M. le professeur G. Bertrand voulut bien me donner l'idée d'examiner l'influence que pourraient avoir sur mes deux *Proteus* les passages croisés sur viande stérilisée et par l'organisme du cobaye.

Dans ce but, j'ai exécuté les manipulations suivantes :

1° *Passages sur viande.* — Comme milieu, j'ai employé de la viande hachée finement et stérilisée 30 minutes à 115°. Après avoir vérifié la stérilité de mes tubes de pulpe de viande j'en aiensemencé deux, l'un que j'ai étiqueté V₁ avec le *Proteus* V, l'autre étiqueté M₁ avec le *Proteus* M. Après une semaine de séjour à 37°, je me suis servi des cultures ainsi obtenues pour ensemenecer deux autres nouveaux tubes de viande stérilisée que j'ai de même abandonnés 7 jours à l'étuve. Au bout de ce temps, j'ai constaté la pureté de mes cultures etensemencé deux tubes de gélose ordinaire inclinée étiquetés respectivement V₁ et M₁.

2° *Passages par l'organisme du cobaye.* — Pour mes inoculations j'ai émulsionné dans 10^{cm³} d'eau physiologique (NaCl 9 pour 1000) des cultures de 24 heures sur gélose inclinée, de mes *Proteus* M et V. J'ai injecté dans le péritoine deux cobayes d'environ 300^g avec respectivement 1^{cm³} de chaque émulsion. Tous deux sont morts en moins de 24 heures; j'ai fait immédiatement leur autopsie et prélevé aseptiquement le sang du cœur. Avec celui-ci j'aiensemencé l'eau de condensation de deux tubes de gélose inclinée fraîche. Après 24 heures à 37° les *Proteus* les avaient envahis; j'ai vérifié la pureté de chaque culture et je les ai repiquées sur gélose. Après avoir maintenu mes tubes 24 heures à 37°, c'est avec ces deux dernières cultures que j'ai inoculé deux nouveaux cobayes dans le péritoine. Aussitôt après leur mort, j'ai prélevé aseptiquement le sang du cœur et isolé à nouveau les deux *Proteus* par ensemencement de l'eau de condensation d'un tube de gélose. Avec les deux cultures ainsi obtenues j'ai réensemencé deux tubes de gélose inclinée étiquetés M₂ et V₂.

3° *Contrôle de la pureté des germes modifiés.* — J'aiensemencé immédiatement quatre séries de tubes de gélatine ordinaire avec les quatre cultures résultant des opérations que je viens de décrire; je les ai coulées en boîtes de Pétri et, après trois jours d'étuve à 22°, j'ai choisi de chaque série la colonie présentant le mieux les caractères du *Proteus* et je l'ai repiquée en gélose ordinaire. J'ai eu ainsi quatre cultures absolument pures des *Proteus* M₁, M₂, V₁ et V₂, races nouvelles obtenues à la suite de

passages sur viande ou par le cobaye. Voici d'ailleurs un Tableau résumant l'origine de ces divers *Proteus* :

V, *Proteus* isolé de la viande en putréfaction et cultivé depuis sur gélose ordinaire;

V₁, *Proteus* V repiqué deux fois sur viande stérilisée, puis cultivé sur gélose ordinaire;

V₂, *Proteus* V ayant subi deux passages consécutifs par l'organisme du cobaye, puis cultivé sur gélose ordinaire.

M, *Proteus* isolé des matières fécales d'un enfant atteint de gastro-entérite, puis cultivé sur gélose ordinaire;

M₁, *Proteus* M repiqué deux fois sur viande stérilisée, puis cultivé sur gélose ordinaire;

M₂, *Proteus* M ayant subi deux passages consécutifs par l'organisme du cobaye, puis cultivé sur gélose ordinaire.

4^e *Étude des caractères biochimiques.* — J'ai étudié ces quatre races en les ensemençant dans des milieux préparés avec les mêmes produits et dans les conditions absolument identiques à celles que j'ai décrites à propos de V et de M. Les cultures ont été réalisées exactement dans les mêmes conditions et analysées de la même façon. Je m'abstiendrai donc de donner le détail de mes expériences et je me contenterai d'en exposer les résultats.

GLUCOSE.

Teneur en glucose de 50 ^{cm} ³ de :	g	Consommé pour 100.
milieu non ensemenché.....	1,399	»
culture de V ₁	0,492	64,8
culture de V ₂	0,415	70,2
culture de M ₁	0,326	76,7
culture de M ₂	0,361	74,2

LÉVULOSE.

Teneur en lévulose de 50 ^{cm} ³ de :	g	Consommé pour 100.
milieu non ensemenché.....	1,417	»
culture de V ₁	0,644	54,5
culture de V ₂	0,689	51,3
culture de M ₁	0,544	61,7
culture de M ₂	0,677	52,2

GALACTOSE.

Teneur en galactose de 50 ^{cm} ³ de :	g	Consommé pour 100.
milieu non ensemencé	1,284	»
culture de V ₁	0,165	87,2
culture de V ₂	0,069	94,6
culture de M ₁	0,042	96,7
culture de M ₂	0,064	95

SACCHAROSE.

Teneur en 50^{cm}³ de milieu.

Avant hydrolyse (calculé en sucre interverti).	Après hydrolyse		Saccharose consommé pour 100.
	(sucre interverti).	(calculé en saccharose).	
Témoin..... g	g	g	»
.....	1,493	1,418	»
Culture de V ₁ 0,110	0,110	0,104	92,6
Culture de V ₂ 0,138	0,138	0,132	90,7
Culture de M ₁ 0,516	0,566	0,538	62
Culture de M ₂ 0,418	0,475	0,451	68,1

On voit que les *Proteus* V₁ et V₂ non seulement ont consommé une grande quantité de saccharose, mais encore qu'ils ont interverti toute la quantité restante. Le *Proteus* M₁ n'a laissé intact que 0^g,0477 de saccharose et le M₂ 0^g,0538.

LACTOSE.

Pour les raisons exposées plus haut au sujet des cultures de V et M (p. 43), je ne donnerai ici que les dosages après inversion. Les résultats suivants sont donc également la moyenne arithmétique des calculs en glucose et en galactose, et par conséquent sont soumis à la même cause d'erreur.

Teneur en 50^{cm}³ de milieu.

	Lactose ordinaire.		Lactose anhydre.	Consommé pour 100.
Témoin.....	1,440	correspondant à	1,368	»
Culture de V ₁ .	1,289	»	1,224	10,5
Culture de V ₂ .	1,234	»	1,172	14,8
Culture de M ₁ .	1,257	»	1,194	12,6
Culture de M ₂ .	1,234	»	1,172	14,8

On voit que les *Proteus* V₂ et M₂, ceux qui ont subi le même traitement modificateur, ont attaqué la même quantité de lactose.

MALTOSE.

Pour ce biose je donne seulement les résultats du dosage après hydrolyse : ceux-ci ne sont pas soumis à la même cause d'erreur qu'avec le lactose, puisque le maltose ne donne par hydrolyse qu'un seul sucre, le glucose; mais par contre les résultats avant hydrolyse seraient inexacts à cause de la présence de deux sucres.

Les quantités trouvées après hydrolyse sont les suivantes, exprimées en même temps en maltose ordinaire ou à une molécule d'eau et en glucose, puisque $C^{12}H^{22}O^{11} + H^2O$ donne $2C^6H^{12}O^6$:

Teneur en 50^{cm}³ de milieu.

		Consommé pour 100.
Témoin.....	1,435	»
Culture de V ₁	0,487	66,1
Culture de V ₂	0,526	63,3
Culture de M ₁	1,267	11,66
Culture de M ₂	1,337	6,84

GLYCÉRINE.

Teneur en 50^{cm}³ de milieu.

		Consommé pour 100.
Témoin.....	2,353	»
Culture de V ₁	2,353	0
Culture de V ₂	2,110	10,3
Culture de M ₁	1,976	16
Culture de M ₂	1,916	18,5

Comme on le voit, le *Proteus* V₁ n'a pas touché la glycérine. Ce fait étant surprenant, je l'ai vérifié par l'analyse d'une culture témoin et en répétant l'expérience. Les résultats de ces analyses ont absolument confirmé ceux de la première. L'aspect de la culture des deux fioles de V₁ ne faisait pourtant pas prévoir cette anomalie, le V₁ s'étant en apparence développé comme le V₂, le M₁ et le M₂.

GÉLATINE.

		Consommé pour 100.
Témoin	^g 1,189	»
Culture de V ₁	0,836	29,7
Culture de V ₂	1,137	4,4
Culture de M ₁	0,685	42,4
Culture de M ₂	0,146	87,7

ALANINE.

		Consommé pour 100.
Témoin	^g 1,46	»
Culture de V ₁	1,37	6,1
Culture de V ₂	1,32	9,6
Culture de M ₁	1,46	0
Culture de M ₂	1,46	0

ACIDE ASPARTIQUE.

		Consommé pour 100.
Témoin	^g 1,732	»
Culture de V ₁	1,220	29,6
Culture de V ₂	1,496	13,6
Culture de M ₁	1,436	17,1
Culture de M ₂	1,515	12,5

TRYPTOPHANE.

I. — Dosage de l'indol.

	Indol.	Tryptophane transformé en indol pour 100.
Culture de V ₁ (100 ^{cm} ³)	^g 0,076	66,2
Culture de V ₂ (100 ^{cm} ³)	0,061	53,1

Les cultures de M₁ et M₂ n'ont pas produit de l'indol.

II. — Dosage de l'acide indol 3-acétique.

	Acide indolacétique.	Tryptophane transformé en acide indolacétique pour 100.
	g	g
Culture de V ₁	0,013	7,86
Culture de V ₂	0,019	11,2
Culture de M ₁	0,062	36,3
Culture de M ₂	0,083	48,4

III. — Calcul du tryptophane consommé
par tous les *Proteus* étudiés.

	Tryptophane transformé en		Tryptophane consommé.
	en indol.	acide indolacétique.	
V (pour 100).....	53,7	12,6	66,3
V ₁ »	66,2	7,86	74,2
V ₂ »	53,1	11,2	64,3
M »	0	46,6	46,6
M ₁ »	0	36,3	36,3
M ₂ »	0	48,4	48,4

En collationnant tous les résultats de ces divers essais et en les confrontant avec ceux que m'avaient fournis les *Proteus* originels V et M on obtient le Tableau ci-dessous, qui permet de se rendre compte de l'action des changements de milieu que j'ai réalisés :

	Quantités consommées (pour 100).					
	V.	V ₁ .	V ₂ .	M.	M ₁ .	M ₂ .
Glucose	98,6	64,8	70,2	98,9	76,7	74,2
Lévulose.....	17,6	54,5	51,3	72,8	61,7	52,2
Galactose.....	98,9	87,2	94,6	94,4	96,7	95,0
Saccharose.....	81,6	92,6	90,7	66,8	62,0	68,1
Lactose.....	3,1	10,5	14,8	7,4	12,6	14,8
Maltose.....	68,1	66,1	63,3	0	11,6	6,8
Glycérine	26,0	0	10,3	49,1	16,0	18,5
Gélatine.....	0,59	29,7	4,4	84,0	42,4	87,7
Alanine.....	0	6,1	9,6	6,0	0	0
Acide aspartique.....	6,0	29,6	13,6	8,3	17,1	12,5
Tryptophane transformé en indol et acide indolacétique.....	66,3	74,06	64,3	46,6	36,3	48,4
Tryptophane transformé en indol.	53,7	66,2	53,1	0	0	0
Tryptophane transformé en acide indolacétique.....	12,6	7,86	11,2	46,6	36,3	48,4

IV. — DISCUSSION DES RÉSULTATS.

A l'inspection de ces chiffres on voit qu'au point de vue de la destruction des hydrates de carbone les passages sur viande et par l'organisme animal ont en somme peu d'influence, à part l'apparition d'une action sur le maltose dans les races dérivées de M. Par contre l'action sur la glycérine s'est trouvée dans l'ensemble incontestablement diminuée. L'influence sur le pouvoir protéolytique traduit une augmentation pour les races V, mais pour les races M les résultats sont discordants. Avec l'acide aspartique l'augmentation du pouvoir acidaminolytique est nette, sinon importante, tandis que pour l'alanine les variations sont de sens contraire pour les deux groupes.

Avec le tryptophane l'influence des passages est faible, aussi bien quand on considère la somme des dérivés que si l'on envisage séparément la formation d'indol ou d'acide indol-3-acétique. Cette influence a été trop faible pour rendre apparent le pouvoir indologène insignifiant de la race M, ce qui pourtant est réalisable par des nombreux passages en milieux riches en tryptophane ainsi que l'ont montré les recherches de A. Berthelot. Je tiens justement de cet auteur que le *Proteus* M est une des races qui lui avaient permis d'établir la possibilité de cette variation.

En résumé, si grande que soit la variabilité du *Proteus vulgaris*, les changements de milieu auxquels j'ai soumis les deux variétés que j'ai étudiées n'ont pas été assez importants pour affecter notablement leurs propriétés biochimiques. Par conséquent il est vraisemblable que celles-ci n'ont guère pu se modifier spontanément au cours de mes recherches, et que leur constance aurait été suffisante pour servir *éventuellement* de base à une distinction d'espèces.

Toutefois, si faible qu'ait été l'influence de ces changements de milieu, elle a été suffisante pour modifier légèrement les deux caractères qui seuls différenciaient quelque peu les deux races originelles : l'action sur le maltose nulle pour le *Proteus* M et l'action sur l'alanine nulle pour le *Proteus* V.

Ces deux caractères biochimiques étant modifiables sous des influences minimes, et la question de la variabilité du pouvoir

indologène étant tranchée par les expériences de A. Berthelot, il en résulte que, malgré leur diversité d'origine, les deux *Proteus* M et V constituent deux races de *Proteus vulgaris* et non deux espèces distinctes. Les résultats fournis par la recherche croisée de l'agglutination à l'aide de sérums d'animaux immunisés confirment d'ailleurs les résultats de l'étude des propriétés biochimiques. De plus, il est bon de noter la légère différence qui existe entre les résultats des essais quantitatifs et des essais qualitatifs; en effet, avec le lévulose, seul le *Proteus* M rend acides les cultures, tandis que les analyses montrent que ce sucre est attaqué par les deux microbes. Les cultures en eau peptonée maltosée ne deviennent acides qu'avec le *Proteus* V; les dosages ont tout d'abord confirmé ce résultat qui s'est trouvé ensuite infirmé par les analyses des cultures du *Proteus* M modifié par des passages. Enfin, le lactose qui, qualitativement, semble inattaqué par les deux races, est pourtant consommé par elles en petite quantité ainsi que l'ont établi les déterminations pondérales.

Ces faits sont intéressants, car ils montrent combien il faut être prudent quand on veut distinguer des espèces microbiennes voisines. Ils mettent en évidence la nécessité des restrictions que Berthelot a introduites dans les conclusions de son travail, restrictions que j'ai signalées plus haut et qui ont été le point de départ de mes recherches. Ils font voir également qu'il ne faut accepter que sous bénéfice d'inventaire les caractères biochimiques attribués à certains microbes par nombre de bactériologistes; ceux-ci qui bien souvent n'ont aucune pratique chimique, se contentent généralement d'examiner après 24 ou 48 heures la réaction au tournesol de cultures en milieux sucrés et n'hésitent pas cependant à affirmer que tel ou tel sucre est ou n'est pas attaqué. Seuls les dosages permettent de s'exprimer ainsi et quand on ne peut les exécuter ou qu'ils paraissent inutiles, il faut se contenter de dire que tel ou tel microbe, cultivé *pendant un temps donné*, en présence de l'hydrate de carbone considéré, communique aux cultures telle ou telle réaction au tournesol.

En terminant cet exposé de mes recherches, je dois exprimer le regret de n'avoir pu les compléter comme je l'aurais désiré. J'ai bien établi que mes *Proteus* attaquent tous les deux un cer-

tain nombre d'aliments azotés et hydrocarbonés, mais il aurait également fallu préciser, qualitativement et quantitativement, la nature des produits formés aux dépens de ces substances. Étant donnée la concordance des caractères morphologiques et des propriétés biologiques, ainsi que des caractères biochimiques que j'ai examinés, il y a de grandes chances pour que les résultats de mes essais n'aient pas été modifiés par des recherches de ce genre, mais cependant il aurait été intéressant de les entreprendre. Je voulais en faire l'objet d'un nouveau travail; malheureusement, la guerre m'ayant forcé d'interrompre mes études, mes cultures n'ont pas été repiquées à temps et je ne possède plus les deux races de *Proteus* dont je désirais poursuivre l'étude.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

I. J'ai étudié comparativement deux races de *Proteus vulgaris* Hauser, l'une isolée par M. le Professeur Metchnikoff dans le contenu intestinal d'un nourrisson mort de gastro-entérite, l'autre par moi dans de la viande en putréfaction.

L'examen de ces deux microbes par les méthodes bactériologiques usuelles m'a montré qu'ils ne présentaient pas de différences morphologiques, physiologiques ou biochimiques importantes et que leurs caractères correspondaient bien à ceux qui sont attribués par la majorité des auteurs à l'espèce *Proteus vulgaris* Hauser.

II. L'étude quantitative de l'action de ces deux germes sur les hydrates de carbone m'a permis d'établir que les deux races originelles attaquaient plus ou moins activement le glucose, le lévulose, le galactose, le saccharose, le lactose et la glycérine. Le *Proteus* saprophyte seul attaquait le maltose.

III. Toujours en opérant quantitativement, j'ai observé que les deux races consommaient la gélatine mise à leur disposition, mais tandis que le germe pathogène en détruisait 84 pour 100, le germe saprophyte n'attaquait que 0,59 pour 100 de cette source d'azote et de carbone. Cette différence considérable n'est pas surprenante en raison de la variabilité très grande du pouvoir protéolytique des microbes.

Au point de vue de leur action sur les acides aminés, j'ai constaté que les deux microbes attaquaient presque également l'acide aspartique, mais seul le *Proteus* pathogène faisait disparaître une faible proportion de l' α -alanine qui lui avait été donnée comme aliment azoté.

Enfin les deux germes attaquaient le tryptophane; mais, tandis que le *Proteus* saprophyte poussait la désintégration de la molécule aminée jusqu'à l'indol, le *Proteus* pathogène n'allait que jusqu'au stade acide indol-3-acétique.

IV. J'ai fait subir aux deux races originelles deux passages croisés sur viande stérilisée et dans l'organisme du cobaye. Sous cette

influence les propriétés biochimiques se sont dans l'ensemble plus ou moins modifiées. La propriété d'attaquer le maltose est apparue dans les races dérivées du germe pathogène. La variabilité du pouvoir protéolytique s'est traduite par une augmentation fort nette pour les races dérivées du microbe saprophyte, mais les résultats fournis par les races provenant du germe pathogène ont été discordants.

Les passages ont fait apparaître dans les dérivés de la race saprophyte le pouvoir d'attaquer l' α -alanine et l'a fait disparaître pour les descendants de la race pathogène. Par contre, le pouvoir acidaminolytique vis-à-vis de l'acide aspartique s'est trouvé nettement augmenté pour toutes les nouvelles races.

L'influence des passages sur la faculté d'attaquer le tryptophane a été faible; elle a notamment été impuissante à rendre apparent le faible pouvoir indologène du *Proteus* pathogène que j'ai observé, dans certaines conditions, dans des cultures obtenues avec des milieux contenant comme seule source de carbone et d'azote une quantité de tryptophane beaucoup plus grande que celle que j'ai employée pour les milieux utilisés dans mes recherches quantitatives.

V. Mes recherches personnelles et les travaux antérieurs de nombreux auteurs ayant établi la variabilité de l'action des *Proteus* sur les hydrates de carbone, aussi bien que sur les substances protéiques, les acides aminés et particulièrement le tryptophane, il en résulte que, malgré leur diversité d'origine, les deux *Proteus* que j'ai étudiés constituaient deux races de *Proteus vulgaris* et non deux espèces distinctes. Ainsi que le pensait M. le professeur Metchnikoff, les *Proteus* pathogènes sont identiques aux *Proteus* saprophytes et les faibles différences que présentent les diverses races résultent simplement de l'influence plus ou moins prolongée des conditions diverses de milieu. En ce qui concerne particulièrement les deux races que j'ai examinées, les recherches croisées de l'agglutination à l'aide de sérums d'animaux immunisés confirment les résultats des recherches biochimiques.

VI. Dans une étude ayant pour but de rechercher l'existence éventuelle de caractères différentiels suffisants pour la distinction

de deux espèces il est impossible, bien entendu, de tenir compte des résultats obtenus par les méthodes qualitatives. Les faits que j'ai observés en donnent une nouvelle preuve. En effet, en opérant comme la majorité des bactériologistes (et même avec des précautions que n'observent qu'un petit nombre d'entre eux) seul le *Proteus* pathogène rendait acides les milieux contenant du lévulose, tandis que les analyses quantitatives montraient que ce sucre était attaqué par les deux microbes. Les cultures en eau peptonée maltosée ne devenaient acides qu'avec le germe saprophyte; les dosages avaient tout d'abord confirmé ce résultat qui s'est trouvé infirmé par les analyses des cultures du *Proteus* pathogène modifié par les passages. Enfin, le lactose qui, qualitativement, semblait inattaqué par les deux races, est cependant utilisé par elles ainsi que l'ont établi les déterminations pondérales.

Pour séparer les espèces microbiennes on ne devrait donc jamais se fonder seulement sur les caractères biochimiques observés à l'aide des procédés qualitatifs. L'emploi des dosages est absolument nécessaire, ainsi que leur application à l'étude parallèle de races nouvelles, obtenues en soumettant simultanément les germes examinés à des influences susceptibles de déterminer des variations de leurs propriétés physiologiques.

Vu et approuvé :

Paris, le 19 juillet 1917.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,
PAUL APPELL.

Vu et permis d'imprimer :

Paris, le 19 juillet 1917.

LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS.

Pour le Vice-Recteur en congé,

L'INSPECTEUR CHARGÉ DE L'ADMINISTRATION
DE L'ACADÉMIE,
ISTRIA.

BIBLIOGRAPHIE.

1. HAUSER, *Ueber Fäulnissbakterien; ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze*, F.-G.-W. Vogel, Leipzig, 1885.

2. MEYERHOF, *Ueber einige biologische tierpathogenen Eigenschafsten der B. Proteus* (*Centralblatt f. Bakteriologie*, Bd. XXIV, 1898, p. 18).

3. TILS, *Bakteriologische Untersuchung der Freiburger Leitungswasser* (*Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. IX, 1890, p. 282).

— PFUHL, *Typhus abdominalis mit Ikterus* (*Deutsche militärärztll. Zeitschr.*, 1888, p. 385).

— MOUGINET, *Quelques bactéries des putréfactions* (Thèse, Nancy, 1890).

— POKROWSKI, *Mikroorganismen aus dem Wasser des Kura-Flusses und Tifliser Wasserleitung, etc.* [*Protok. d. Kaucaise-med. Gesellsch.*, 1891, n° 4 (Russisch); Ref. *Baumg. Jahrsbericht*, Bd. VII, 1891, p. 345].

— MAGGIORA, *Ein mikroskopische und bakteriologische Beobachtungen während einer epidemischen dysenterischen Dickdarmen-zündung* (*Centralblatt f. Bakt.*, Bd. XI, 1892, p. 173 et 184).

— JÄGER, *Die Aetiologie des infektiösen fieberhaften Ikterus (Weil'sche Krankheit)* (*Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. XII, 1892, p. 525).

— ZIMMERMANN, *Die Bacterien unserer Trink- und Nutzwässer, insbesondere des Wassers der Chemnitzer Wasserleitung*. Chemnitz, 1890.

— MEZ, *Die mikroskopische Wasseranalyse* (Berlin, 1898).

4. FÜLLES, *Bakteriologisch Untersuchung des Bodens in Freiburg i. B. und Umgebung* (*Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. X, 1890, p. 282).

— GRUSDEFF, *Die Mikroorganismen des Staubes auf dem Wolga-Dampfern* [*Milit. med. Zeitschr.* (Saint-Petersburg, 1891); Ref. *Centralblatt f. Bakt.*, Bd. XI, 1892, p. 201].

5. WELZ, *Bakteriologisch Untersuchung der Luft in Freiburg i. B. und Umgebung* (*Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. XI, 1891, p. 121).

6. A. SARTORY et Marc LANGLAIS, *Poussières et microbes de l'air* (Paris, 1912).

7. MOUGINET, *Quelques bactéries des putréfactions* (Thèse de Nancy, 1891).

— SANFELICE, *Contributo alla biologia e morfologia dei batterii saprogeni aerobi e anaerobi* (*Atti della Acad. medica di Roma*, seria II, vol. V, anno XVI; Ref. *Centralblatt f. Bakt.*, Bd. XI, 1891, p. 87).

— TISSIER et MARTELLY, *Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie* (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, p. 865).

8. SCHIRANK, *Untersuchung über den in Hühnerei die stinkenden Fäulniss hervorruufenden Bacillus* (*Medizin. Jahrbücher.*, Wien, 1888, p. 363).

9. MARPMANN, *Mitteilungen aus Marpmann's bakter. Laboratorium* (*Centralblatt f. Bakt.*, Bd. XXI, 1897, p. 274).

10. CH. CANTÙ, *Le Bacillus Proteus, sa distribution dans la nature* (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, novembre 1911, p. 852).

11. ÉLIE MEICHIKOFF, *Étude sur la flore intestinale* (4^e Mémoire). II. *Bactériologie du choléra infantile des nourrissons* (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVIII, n^o 2, février 1914).

12. FOA et BONOME, TITO CARBONE in MEYERHOF, *Centralblatt f. Bakt.*, Bd. XXIV, 1898, p. 18.

13. LANNELONG et ACHARD, *C. R. de l'Académie des Sciences*, octobre 1896.

14. M. WEINBERG, *Recherches bactériologiques sur la gangrène gazeuse* (*C. R. de la Société de Biologie*, séance du 31 octobre 1914, p. 506-508).

15. A. SARTORY, L. SPILLMANN et Ph. LASSEUR, *C. R. de l'Académie des Sciences*, 15 février 1915.

16. A. BERTHELOT, *Recherches sur quelques caractères du Proteus vulgaris* (Thèse de médecine, Paris, 1913).

17. PASTEUR, *Études sur la bière* (Paris, 1876).

18. A. FITZ, *Bericht d. d. chem. Gesells.*, t. IX, X, XI, XIII, XV.

19. PERDRIX, *Sur une fermentation produite par un bacille anaérobie de l'eau* (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. V, 1891).

20. GRIMBERT, *Fermentation anaérobie produite par le Bacillus orthobutylicus* (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. VII, 1893).

21. LAURENT, *Nutrition hydrocarbonée et azotée de la levure* (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. III, 1889).

22. THYLMANN et HILGER, *Archiv f. Hygiene*, t. VIII, p. 451.

23. RAU, *Archiv f. Hygiene*, t. XIV, p. 225.

24. EFFRONT, *C. R. de l'Académie des Sciences*, 1896.
25. PÉRÉ, *Sur la formation des acides lactiques isomériques* (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. VII, p. 737).
26. E. DUCLAU, *Traité de Microbiologie*, t. I, chap. XIII, 1898. Masson, Paris.
27. Pour plus amples détails, voir :
- 1° KOLLE und WASSERMANN, *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Aufl. 2. Bd. I, Kap. L : Variabilität der pathogenen Bakter., Gotschlich.
- 2° W. KRUSE, *Allgemeine Mikrobiologie*, Kap. XVIII, (Vogel, Leipzig).
28. LIBORIUS, *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. I, p. 156.
29. SANFELICE, *Annali d'igiene*, 1892.
30. HUPPE et WOOD, *Centralblatt Bakt.*, Ref. VIII, p. 267.
31. PECKHAM, *Journal of experimental medicine*, 1897.
32. RODET et RONA, *Bulletin médical*, 1892. p. 865.
33. NEISSER et MASSINI, *Archiv f. Hygiene*, Bd. LXI, 1907.
34. BURK, *Centralblatt für Hygiene*, Bd. LXV.
35. SAUERBECK, *Centralblatt f. Bakter.*, Bd. L, 1909.
36. TWORT, *Proceedings Royal Society*, vol. LXXIX, 1907, p. 329.
37. Voir notamment :
- Maurice NICOLLE, DEBAINS et LOISEAU, *Études sur le bacille de Shiga* (*Annales de l'Institut Pasteur*, août 1916, p. 364).
- DEBAINS, *Sur les bacilles du groupe Flexner-Y* (*Annales de l'Institut Pasteur*, février 1917, p. 73).
- D'HÉRELLE, *Contribution à l'étude de la dysenterie* (*Bulletin de l'Académie de Médecine*, 28 novembre 1916, p. 425).
38. CELLI et SANTORI, *Centralblatt f. Bakter.*, Abt. I, Bd. XV, 1894, p. 789.
39. CLAUSSEN, *Centralblatt f. Bakter.*, Abt. I, Bd. XVI, 1894, p. 325.
40. GOODMAN, *Journal of infect. diseases*, 1908.
41. E. KAYSER, *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Paris, 1894.
42. SCHIERBECK, *Archiv f. Hygiene*, Bd. XXXVIII, p. 294.
43. Ch. RICHT, *La fermentation lactique et les sels de thallium, Étude sur l'hérédité* (*Annales de l'Institut Pasteur*, février 1917).
44. A. BERTHELOT, *Application d'une peptone protéolytique de viande et muqueuse intestinale à la préparation des milieux de culture* (*C. R. de la Société de Biologie*, 17 mars 1917).

43. A. BERTHELOT, *Sur la toxicité de certaines préparations commerciales obtenues par hydrolyse totale de la viande* (*C. R. de la Société de Biologie*, séance du 17 janvier 1914).

46. Gabriel BERTRAND, *Le dosage des sucres réducteurs* (*Bulletin des Sciences pharmacologiques*, n° 1, janvier 1907).

— G. BERTRAND et Pierre THOMAS, *Guide pratique pour les manipulations de Chimie biologique*, 2^e édition, Dunod et Pinat, Paris, 1913.

47. PATEIN, *Bulletin de la Société de Biologie*, 1907, p. 1373.

48. L.-C. MAILLARD, *Genèse des matières protéiques et des matières humiques*, Masson, Paris, 1913.

49. B. TOLLENS, *Les hydrates de carbone*, édition française, 1896.

50. G. BERTRAND et G. WEISSWEILER, *Action du ferment bulgare sur le lait* (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XX, décembre 1906, p. 986).

51. L. GAILLARD, *Thèse de Médecine*, Paris, 1897.

52. E. BERTAINCHAND, *Annales des Falsifications*, mai 1913.

53. Gabriel BERTRAND, *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Paris, 1904, p. 66 et suiv.

54. A. FERNBACH, *C. R. de l'Académie des Sciences*, 28 novembre 1910.

55. L. GAUTHIER, *Thèse de Pharmacie*, Lyon, 1912.

56. Léon FELTZ, *Le Proteus vulgaris Hauser* (Thèse de Pharmacie, 1900).

57. L. GRIMBERT, *De l'unification des méthodes de culture en Bactériologie* (*Archives de Parasitologie*, t. I, n° 2, 1898, p. 191).

58. F.-A. STEENSMA, *Ueber den Nachweis von Indol in Bakterienculturen* (*Centralblatt f. Bakter.*, Original, Bd. XLI, mai 1916, p. 215).

59. J.-J. VAN LOGHEM et J.-C.-W. VAN LOGHEM-POUW, *Beitrage zur Differenzierung Proteus-Grupp* (*Centralblatt f. Bakteriologie*, Original, Bd. LXVI, 24 August 1912).

60. KITASATO, *Die negative Indol-Reaktion der Typhusbazillen im Gegensatz zu anderen ähnlichen Bazillarten* (*Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. VII, 1889, p. 515).

61. EHRLICH, *Ueber die Dimethylaminobenzaldehyd-Reaktion* (*Deutsch. Med. Wochenschrift*, 1901, n° 15).

62. Ch. PORCHER, *Des corps indologènes dans l'urine* (*C. R. de l'Académie des Sciences*, 3 mai 1909).

— Ch. PORCHER et L. PANISSET, *Recherche de l'indol dans les bouillons microbiens* (*C. R. de la Société de Biologie*, 24 août 1909); *Des composés indologènes dans les cultures liquides* (*C. R. de l'Académie des Sciences*, 17 mai 1909).

63. STEENSMA, *Ueber Farbenreaktionen der Eiweisskörper... mit aromatischen Aldehyden und Nitriten* (*Zeitschrift f. physiologische Chemie*, Bd. XLVII, p. 25).

— STEENSMA, *Die Farbenreaktionem in der Biochemie* (*Biochem. Zeitschr.*, Bd. VIII, 1908, p. 203).

— FLEIG, *Réactions colorées du tryptophane, de l'indol, du pyrrol, etc., avec les aldéhydes aromatiques* (*C. R. de la Société de Biologie*, juillet 1908).

— Cl. GAUTHIER, *Réactions de la phloroglucine et de l'orcéine avec le p-diméthylaminobenzaldéhyde* (*C. R. de la Société de Biologie*, 23 mai 1908).

— RHODE, *Die Farbenreaktionen der Eiweisskörper mit p-dimethylaminobenzaldehyd* (*Zeitschr. f. physiol. Chemie*, Bd. XLIV, 1905, p. 161).

64. HOPKINS et COLE, *A contribution to the chemistry of proteids : I. Preparation of tryptophane* (*Journal of Physiology*, t. XXVII, 1901, p. 418). — II. *The constitution of tryptophane and the action of bacteria upon it* (*J. of Physiology*, t. XXIX, 1903, p. 45).

65. A. BERTHELOT, *Recherches sur le Proteus vulgaris* (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVIII, nos 9, 10, 11 et 12, 1914). Au sujet des milieux au tryptophane consulter également : A. BERTHELOT, *Sur l'emploi de milieux chimiquement définis à base de tryptophane* (*C. R. de la Soc. de Biologie*, t. LXXII, p. 595, 20 avril 1912).

66. Hugo ZIPFEL, *Centr. f. Bakt.*, Abt. I, Orig. Bd. LXIV, p. 65 Bd. LXVII, 1912-1913, p. 497.

67. E.-A.-R.-F. BAUDET, *Indol-reaktionen bei Proteusbacillen* (*Folia Microbiologica*, Bd. II, Heft 3, 7 mars 1914).

68. J.-J. VAN LOGHEM, *Bacterium* (Proteus) *anindologenes*, n. sp. (*Folia Microbiologica*, Bd. III, Heft 3, mai 1915).

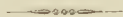


TABLE DES MATIÈRES.

	Pages.
INTRODUCTION.....	1
Généralités sur les variations biochimiques des microbes.....	8

PREMIÈRE PARTIE.

ÉTUDE DES CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES DEUX RACES DE « PROTEUS ».

Origine et mode d'isolement.....	20
Caractères microscopiques.....	21
Caractères physiologiques.....	22
Caractères généraux des cultures.....	23
Caractères biochimiques.....	26
Pouvoir pathogène.....	28
Réactions d'immunité.....	29

DEUXIÈME PARTIE.

ÉTUDE BIOCHIMIQUE COMPARÉE DES DEUX RACES DE « PROTEUS ».

<i>Action sur les hydrates de carbone</i>	<i>30</i>
Action sur le glucose.....	32
» sur le lévulose.....	37
» sur le galactose.....	39
» sur le saccharose.....	40
» sur le lactose.....	42
» sur le maltose.....	46
Appendice à l'action sur les hydrates de carbone.....	47
Action sur la glycérine.....	47
» sur la mannite.....	49
<i>Action sur les matières protéiques et leurs dérivés.....</i>	<i>50</i>
Action sur la gélatine.....	50
» sur les albumoses.....	52

	Pages.
Acides aminés.....	55
Action sur le glycocole	55
» sur l'x-alanine.....	55
» sur l'acide aspartique.....	58
Action sur le tryptophane (étude de la formation d'indol et d'acide indol-3 acétique).....	58
Appendice à l'action sur les matières protéiques et leurs dérivés.....	76
Action sur la peptone de soie.....	76
<i>Influence des variations de milieu sur les propriétés biochimiques.....</i>	<i>76</i>
Traitements subis par les deux races originales.....	77
Étude quantitative des caractères biochimiques des races dérivées.....	78
Action sur le glucose.....	78
» sur le lévulose.....	78
» sur le galactose.....	79
» sur le saccharose.....	79
» sur le lactose.....	79
» sur le maltose.....	80
» sur la glycérine.....	80
» sur la gélatine.....	81
» sur l'alanine.....	81
» sur l'acide aspartique.....	81
Action sur le tryptophane.....	81
Formation d'indol et d'acide indolacétique.....	82
Calcul du tryptophane consommé par tous les <i>Proteus</i> étudiés.....	82
Tableau des actions de tous les <i>Proteus</i> étudiés.....	82
<i>Discussion des résultats.....</i>	<i>83</i>
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	86
BIBLIOGRAPHIE.....	89
TABLE DES MATIÈRES.....	95

SECONDE THÈSE.



PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Botanique. — Les Broméliacées épiphytes.

Minéralogie. — Gîtes de diamants du Brésil.

Vu et approuvé :

Paris, le 19 juillet 1917.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,

PAUL APPELL.

Vu et permis d'imprimer :

Paris, le 19 juillet 1917.

LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,

Pour le Vice-Recteur en congé,

L'INSPECTEUR CHARGÉ DE L'ADMINISTRATION

DE L'ACADÉMIE,

ISTRIA.

PARIS. — IMPRIMERIE GAUTHIER-VILLARS ET C^{ie}

58169 Quai des Grands-Augustins, 55.
